

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la infección "Clostridium difficile": incidencia,
epidemiología, características clínicas, factores de riesgo de gravedad y
recurrencia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elena Reigadas Ramírez

Director

Emilio Bouza Santiago

Madrid, 2016

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina



Tesis Doctoral

**Estudio de la Infección por *Clostridium*
difficile: Incidencia, Epidemiología,
Características Clínicas, Factores de Riesgo
de Gravedad y Recurrencia.**

Doctoranda: Elena Reigadas Ramírez

Director de Tesis: Prof. Emilio Bouza Santiago

Madrid, 2015

A Elena, mi madre, porque sin su esfuerzo, sacrificio y dedicación, nada de esto hubiera sido posible.

y a José Ángel, mi marido, por su paciencia, comprensión y apoyo en todo momento.

Al Dr. Bouza, por permitirme realizar esta tesis, dedicarme su valioso tiempo, sus acertados consejos y por la confianza depositada en mí.

A Luis, por todo el tiempo dedicado, su paciencia, y todo su apoyo. Así como, por introducirme en el mundo de los anaerobios.

A Mercedes y a Adoración, por ayudarme y facilitarme el desarrollo molecular de esta tesis.

A Roberto por su inestimable ayuda en el desarrollo de las pruebas de detección de anticuerpos.

A Antonia, Carmen, Beatriz y Asunción, por toda la ayuda prestada en el laboratorio y por hacerme sonreír tantas mañanas.

A Martha, porque ha sido además de una compañera, una amiga que me ha prestado su apoyo y me ha ayudado a sobrellevar los malos momentos.

Y a todo el servicio de Microbiología del Gregorio Marañón (adjuntos, residentes, técnicos, enfermeras y auxiliares), que me han facilitado en muchos momentos la realización de esta tesis.

A mis amigos, por saber entender mis ausencias.

A mis padres y hermanos, por su cariño, y por la confianza que siempre han tenido en mí.

A José Ángel, mi marido, por estar a mí lado en los buenos y en los malos momentos.

El Prof. D. Emilio Bouza Santiago, Jefe del Servicio de Microbiología Clínica y de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Gregorio Marañón y Catedrático de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado "Estudio de la Infección por *Clostridium difficile*: Incidencia, Epidemiología, Características Clínicas, Factores de Riesgo de Gravedad y Recurrencia" ha sido llevado a cabo bajo mi dirección por Dña. Elena Reigadas Ramírez y reúne las condiciones exigibles para ser presentado como tesis para aspirar a la obtención del grado de Doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado.



Prof. D. Emilio Bouza Santiago

Madrid 22 de junio de 2015.

ÍNDICE

CONTENIDO

SUMMARY.....	9
1. Background	10
2. Shortcomings In The Literature	12
3. Objectives.....	14
4. Material and Methods	14
5. Results	23
6. Discussion	33
7. Conclusions.....	40
INTRODUCCIÓN	42
1. Perspectiva Histórica.....	43
2. Microorganismo y Patogénesis	46
2.1. Enzimas	50
2.2. Quimiotaxis	51
2.3. Adhesión.....	51
2.4. Cápsula.....	52
2.5. Toxinas A y B.....	52
2.5.1. Locus de patogenicidad	52
2.5.2. Actividad de las toxinas.....	54
2.5.3. Estructura de las toxinas	56
2.5.4. Cepas toxA-, toxB+	57
2.5.5. Cepas variantes	59
2.6. Toxina binaria	60
3. Epidemiología.....	62
3.1 Humanos	62
3.1.1 Cambios en la Epidemiología en Europa	65
3.1.2 Infección Comunitaria (C-ICD)	67
3.2 <i>C. difficile</i> en Animales.....	70
3.3 <i>C. difficile</i> en Productos de Alimentación	72
4. Clínica	75
4.1 Portadores Asintomáticos de <i>C. difficile</i>	75
4.2 Presentación Clínica	76
4.2.1. Colitis fulminante	79
4.2.2. Infecciones Extraintestinales	80
5. Factores de Riesgo	82
5.1 Edad	82
5.2 Hospitalización.....	83
5.3 Antibióticos	83
5.4 Otros Factores de Riesgo	84
6. Recurrencia de la Infección	85
7. Diagnóstico.....	87
7.1 Diagnóstico de Laboratorio (Microbiológico).....	87
7.1.1 Tipo de Muestra	87
7.1.2 Número de muestras para el diagnóstico de la ICD	89
7.1.3 Pruebas diagnósticas de curación de la ICD.....	91

7.2 Métodos Diagnósticos de Laboratorio.....	91
7.2.1 Ensayo de Citotoxicidad.....	92
7.2.2 Cultivo Toxigénico.....	94
7.2.3 EIAs- Detección de Toxina.....	96
7.2.4 EIAs- Detección de Antígeno Glutamato Deshidrogenasa.....	97
7.2.5 Pruebas Moleculares.....	98
7.2.6 Algoritmos Diagnósticos.....	99
7.2.7 Métodos de Tipado.....	101
7.3 Evaluación Endoscópica.....	108
7.4 Diagnóstico de Imagen.....	109
7.5 Diagnóstico Anatomopatológico.....	111
8. Tratamiento.....	113
8.1 Tratamiento Médico.....	113
8.1.1 Antibióticos.....	113
8.1.2 Tratamientos Alternativos.....	122
8.2 Tratamiento Quirúrgico.....	126
9. Prevención y Control.....	127
9.1. Precauciones de Contacto.....	128
9.2. Higiene de Manos.....	129
9.3 Limpieza del Ambiente.....	129
9.4 Programas de Control de Antibióticos.....	131
9.5 Vacunación.....	132
OBJETIVOS.....	136
MATERIAL Y MÉTODOS.....	138
1. Procesamiento de las muestras para el diagnóstico de la ICD.....	139
1.2.- Cultivo toxigénico de las muestras en medio selectivo de agar <i>Clostridium</i> (bioMeriëux).....	144
1.3.- Citotoxicidad directa sobre muestra.....	145
2. Selección de pacientes con ICD y seguimiento.....	146
3. Definiciones.....	147
4. Recogida de datos epidemiológicos y clínicos.....	150
5. Detección de anticuerpos antitoxina.....	151
6. Caracterización fenotípica de los aislados de <i>C. difficile</i>	154
6.1.- Concentración de <i>Clostridium difficile</i> toxigénico (CDT) en la muestra.....	154
6.2.- Concentración de toxinas.....	155
6.3.- Tasa de esporulación.....	157
6.4.- Tasa de germinación.....	158
6.5.- Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos.....	160
6.5.1 Determinación de sensibilidad de los aislados sin congelar de <i>C. difficile</i>	160
6.5.2 Determinación de sensibilidad a antimicrobianos por el método de dilución en agar de aislados previamente congelados <i>C. difficile</i>	163
7. Caracterización genotípica de los aislados de <i>C. difficile</i>	168
7.1.- Extracción de ADN.....	168
7.2.- Detección de los genes de las toxinas A (tcdA), B (tcdB) y binaria (cdtA y cdtB).....	168
7.3.- Ribotipado.....	168
RESULTADOS.....	171
1.1 Características demográficas y clínicas basales de los pacientes con de ICD.....	173

1.5 Episodios de ICD no sospechados por el clínico (No-S-ICD) y comparación con los episodios de ICD con sospecha clínica (S-ICD)	181
2. Presentación, gravedad y evolución de la ICD de origen comunitario y de adquisición relacionada con la asistencia sanitaria	185
2.1 Incidencia de los distintos tipos de ICD en función del potencial lugar de adquisición de acuerdo a las guías internacionales.....	185
2.2 ICD de adquisición relacionada con la asistencia sanitaria	186
2.3 ICD de adquisición en la comunidad	187
2.4 ICD de adquisición indeterminada	188
2.6 Reclasificación de los episodios de ICD comunitario según criterios de exposición.....	191
3. Factores de riesgo (predictores clínicos) de mala evolución	192
4. Factores de riesgo microbiológicos de mala evolución (combinación de predictores clínicos y microbiológicos)	196
4.1 Características microbiológicas de las cepas de <i>C. difficile</i>	196
4.1.1 Concentración de unidades formadoras de colonia de CDT/gramo	196
4.1.2 Concentración de toxina/gramo	196
4.1.3 Tasa de Esporulación.....	198
4.1.4 Tasa de Germinación	198
4.1.5 Sensibilidad antimicrobiana.....	199
4.3 Predictores microbiológicos de mala evolución: Regla de predicción combinada	201
5. Comportamiento clínico y evolución de la ICD en relación a las características moleculares.....	202
5.1 Toxina Binaria.....	202
5.2 Ribotipos.....	206
5.2.1. Comparación de los principales ribotipos de las cepas de <i>C. difficile</i>	206
5.2.2. Evolución de los episodios de ICD en función de los principales ribotipos de las cepas de <i>C. difficile</i>	208
5.2.3. Caracterización molecular de los episodios de ICD recurrentes: Recidiva y Reinfección.....	209
DISCUSIÓN	210
CONCLUSIONES	224
CONCLUSIONS.....	227
ANEXO 1. Protocolo Clínico y Epidemiológico	228
BIBLIOGRAFÍA	236

SUMMARY

1.

Background

Clostridium difficile causes a broad range of diseases in humans, from mild colitis to pseudomembranous colitis and disease refractory to treatment, fulminant and fatal. It is an infection whose frequency, seriousness and related morbidity and mortality have increased in recent years [1-4]. Nowadays it is regarded as an emerging public health problem, and prevention and monitoring are particularly recommended.

In recent years, different authors have described a change in its epidemiology, which affects not only the populations traditionally involved, but also children and patients from the community [2, 5]. Moreover, the Spanish situation has proven to be different, in terms of the ribotypes present, to other countries in Europe, Canada and the USA. Thus, the performance of an in-depth study in this type of patients in Spain, as well as the source of the acquisition of *Clostridium difficile* infection (CDI), is of major relevance.

The main predisposing factor to acquiring CDI is the use of antibiotics in the previous 8 weeks (90% cases in some series), even with a single prophylactic dose. Other risk factors are a previous stay in health-care centers, particularly hospitals, being old and immunodepression, including transplantations and HIV [6]. The severity of CDI has been associated both with host factors and microorganism-specific factors.

The host-dependent risk factors described in the literature are being old, debilitating diseases such as neoplasm or HIV, presence of *C. difficile* anti-toxin antibodies or prolonged hospital stay, although there is no clear consensus as to which of these factors actually determine the seriousness of CDI [7]. This

uncertainty is even greater when the microorganism-dependent factors are analysed. Certain authors have proposed factors such as the concentration of toxigenic *C. difficile* in stools, its toxigenic capacity, ribotype or sensitivity to metronidazole [6]. The proportion of serious cases of CDI reaches values close to 20% [8, 9], hence having a greater knowledge of its predisposing factors is indispensable.

One of the current challenges is the improvement of the management of recurring diarrhoea by *Clostridium difficile* (R-CDI), whose frequency is also increasing [10, 11]. The recurrence of symptoms after a suitable initial treatment of a diarrhoea episode by *Clostridium difficile* occurs in up to 40% of the cases, and may be due to either relapse of the initial infection or reinfection with a new strain [12]. Recurrence may appear days or weeks after treatment has been completed, and the clinical symptoms may be similar or more serious than those of the initial episode [13].

It has been demonstrated that R-CDI induces increased morbidity and mortality of the infection and prolonged hospital stay, with the subsequent increase in hospital costs. The most frequent risk factors that have been described for the development of R-CDI are the continuous use of antibiotics that predispose to CDI, being old, hypoalbuminaemia, diabetes mellitus and use of antacids [14]. One of the risk factors which has generated most expectation in recent years is the immune response against toxins A and B of *C. difficile*. In the year 2000, a study found that 60% of patients with a primary CDI had detectable levels of anti B toxin antibodies versus only 28% of patients with R-CDI [15]. Moreover, Kyne et al. observed that patients with low levels of anti-toxin A IgG had a much greater probability of relapsing (OR=48) than patients with high levels of anti-toxin [16]. Despite the importance of these findings for

the detection of relapses and the economic impact caused by the implementation of preventive measures, no new studies have been published by other research groups that confirm these assertions.

The antibiotics of choice for the treatment of CDI are metronidazole or vancomycin. However, and despite the fact that both antibiotics have a very high healing percentage, both have a high recurrence rate estimated at 15%-25% [5, 17]. Moreover, in patients with previous recurrence, the probability of having another one is close to 50%. In recent years new antibiotics that appear to be more efficacious than the traditional ones in preventing relapses have been developed, such as fidaxomicin, although the drawback is that they are much more expensive [18]. A better knowledge of the predisposing factors to R-CDI would be useful in helping to target the type of treatment more.

It is important to consider that this infection is associated with an increase in hospital stay close to 20 days and with increased morbidity and mortality, involving a substantial increase in healthcare costs (some studies place the figure at around €10,000 per patient), particularly in patients with R-CDI, the elderly and immunodepressed patients [17, 18]. These facts justify the need for the development of new tools that help in the prevention of CDI and its complications.

2. Shortcomings In The Literature

Since the discovery of *Clostridium difficile*, the disease caused by this microorganism has been associated very particularly with elderly patients previously treated with antibiotics and who had frequently been operated [7, 19].

Subsequently, outbreaks of infection by strains of the 027 ribotype showed that one or more than one of these risk factors might be missing. In recent years it is accepted that a substantial percentage of the episodes of CDI are cases that occur in non-hospitalised patients [2], so we do not fully know what the real predisposing factors are in the aforementioned population, or the proportion of cases that have been in contact with the health care setting.

Moreover, data on incidence in most of the countries and institutions are generated by counting hospital-acquired cases of centers where there is no systematic search for *C. difficile* in non-hospitalised patients.

CDI relapse frequency increases in serious patients, but the data that may provide us with an early orientation as to the population with an increased or decreased risk of relapses are not known. Clinical data only have a limited prediction capacity.

Hence, traditional clinical criteria should be complemented by objective elements that predict a poor evolution, such as the amount of microorganisms and toxins present, their pathogenic power and the response of the host's defence mechanisms.

The hypervirulence of some ribotypes, such as 027, is well known, but the pathogenicity of other ribotypes is as yet unclear. An increase in strains of ribotypes no-027 containing the genes for toxins A and B and genes for the binary toxin has been described, although the clinical implications of these findings are still unknown [20, 21].

3. Objectives

Objective 1. To describe the epidemiology of CDI, which is diagnosed in a setting in which the search for *C. difficile* is applied to all samples of unformed stools of any origin.

Objective 2. To describe and compare the clinical presentation, severity and evolution of community-acquired CDI to health care-related CDI.

Objective 3. To evaluate the efficacy of the prediction of poor evolution based exclusively on the clinical data available at the time of the first episode.

Objective 4. To evaluate the contribution of microbiological factors of the microorganism and host immune response in the prediction of poor evolution of CDI.

Objective 5. To evaluate the clinical behaviour and evolution of CDI with regard to the different ribotypes found.

4. Material and Methods

DESIGN AND STUDY POPULATION

A prospective study was conducted in which systematic testing for toxigenic *C. difficile* on all diarrheic stool samples was performed regardless of the clinician's request and of the origin (hospitalized patients or outpatients). From January 2013 to June 2013, we prospectively included patients (inpatients and outpatients) with a positive result for toxigenic *C. difficile* and either the

presence of diarrhea (≥ 3 unformed stools in a 24 hour period) or colonoscopic findings demonstrating pseudomembranous colitis.

1. Processing of the samples for diagnosis of CDI.

Any diarrheic stool sample received in the laboratory was processed for the diagnosis of CDI regardless of the clinical request. The Microbiology Laboratory of the Hospital General Universitario Gregorio Marañón receives samples of unformed stools from practically the whole population of the Health Area 1 of Madrid, which encompasses approximately 715,000 people. The samples from 13 health centers and 2 rehabilitation hospitals were added to the unformed hospital samples. Samples of stools transported in formaldehyde (parasites) and formed samples were excluded. Rectal exudates or colon biopsy were acceptable in patients with paralytic ileus or megacolon. Once the sample was accepted it was numbered, and the following actions were carried out:

1.1.- Performance of toxigenic *C. difficile* (TCD) rapid detection test.

The rapid test consisted of a diagnostic algorithm based on an immunochromatographic antigen detection (C Diff Quik-Chek Complete assay) and on a real-time PCR of the B toxin gene (XpertTM *C. difficile*).

1.2.- Toxigenic culture of samples in *Clostridium* selective agar medium (bioMérieux).

It was performed on all the samples accepted for the diagnosis of CDI. The plates were incubated in anaerobiosis at 35°C-37°C for 48 hours. Following incubation, the different colonial morphotypes compatible with *C. difficile* were selected with the help of a binocular magnifying glass. The final identification of the colonies suspected of being toxigenic *Clostridium difficile* (TCD) was performed by means of the immunochromatographic system (C Diff Quik-Chek

Complete assay, TechLab, Blacksburg, VA) and the MRC-5 cell line cytotoxicity test.

1.3.- Direct cytotoxicity on the sample.

The MRC-5 cell line was used according to the procedure described in the Anaerobic Bacteriology Manual (Wadsworth, sixth edition, 2002).

A positive result for TCD was regarded as any sample with a positive result with any of the reference techniques (toxigenic culture or direct cytotoxicity in stools). All the TCD strains were stored at -70°C for subsequent analysis.

2. Recruitment of patients with CDI and follow-up.

In the event of detection of a TCD in the laboratory, the patient affected was identified, if it was a patient without any previous episode in the preceding 2 months it was included in the work protocol. Children under the age of 2 years or patients with <3 unformed evacuations over the last 24 hours were excluded from the protocol.

Patients were followed-up throughout the study period and for at least 2 months after their last CDI episode or recurrence (last patient follow-up October 22, 2013).

2.1.- Data collection

Patient information was collected directly at the bedside, data were also obtained by reviewing hospital medical records, accessing the local electronic medical information system, and telephoning patients directly. The data collected included age, sex, hospital department or outpatient clinic diagnosis of CDI, and history of hospital admissions up to 3 months before diagnosis (to

determine the source of CDI). Data regarding the underlying condition were recorded using the McCabe and Jackson prognosis of underlying diseases, and comorbidity factors according to the Charlson index. Data on risk factors for CDI present in the month prior to the diagnosis of CDI were collected (previous antibiotics, proton-pump inhibitors, use of a nasogastric tube, mechanical ventilation, and surgery). Data were also recorded for history of previous CDI episodes, chemotherapy, previous admission to the gastroenterology department, dialysis, inflammatory bowel disease, and infection or colonization by methicillin-resistant *S. aureus*.

The clinical data recorded for the CDI episode were as follows: days of diarrhea, presence of abdominal pain, abdominal distention, fever, hypotension, toxic megacolon, pseudomembranous colitis, and severity of the CDI episode according to ESCMID criteria. Analytical data on the day of diagnosis were recorded. Antibiotic treatment for the CDI episode and outcomes were also recorded (need for ICU admission, need for surgery for CDI episode, recurrence, mortality, and CDI-associated mortality).

3. Antitoxin antibody detection.

Patients initially included in the study who were having their first episode of CDI and who have signed the informed consent were recruited. Serum was extracted on days 3 and 12 of the episode and serum levels of immunoglobulin (IgA and IgG) versus the toxins A and B of *C. difficile* were determined. Microplates with antigens of toxins A and B of *C. difficile* were prepared by TgcBiomics. The antigen-antibody reaction was performed by means of ELISA. The results obtained for each one of the immunoglobulins detected were introduced into a data base for subsequent analysis.

4. Characterization of the CDI-producing *C. difficile* isolates.

4.1- Phenotypical characterization of the isolates.

The following determinations were performed:

4.1.1.- Concentration of TCD in the sample.

To determine the concentration of toxigenic *C. difficile* (colony-forming units [cfu] per gram of stool), the sample was homogenized and subjected to 10-fold serial dilutions. An aliquot of 100 µl of each sample was inoculated quantitatively in ChromID *C. difficile* medium (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). After 48 hours of incubation, cfu were counted (expressed as cfu per gram of stool). This test was performed directly from the stool sample that confirmed the diagnosis.

4.1.2.- Toxigenic capacity.

Toxin quantification was defined as the amount of toxin per gram of stool and was calculated as the product of the concentration of toxigenic *C. difficile* cfu per gram of stool and the quantity of toxins A and B, which was measured using a modified semi-automated ELISA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

4.1.3- Sporulation Rate.

The sporulation rate was determined from *C. difficile* colonies after 5 days' incubation at 37°C and a further 24 hours' incubation at 4°C in Brucella agar. A 0.5 McFarland suspension of the colonies was observed microscopically using a counting chamber. The sporulation rate was calculated

as the number of spores per milliliter divided by the total number of cells (spores and vegetative cells) per milliliter.

4.1.4.- Germinati3n Rate

The germination rate was determined by heating a 0.5 McFarland suspension of *C. difficile* cells at 80°C for 10 minutes to kill all the vegetative cells. The suspension underwent 4 serial dilutions (10-fold). A 100-µl aliquot from each of the 4 dilutions and from the primary suspension was inoculated into Brucella agar, and the colonies were counted after 48 hours of incubation. The germination rate was calculated as the number of cfu per milliliter divided by the microscopic counts of spores per milliliter.

4.1.5.- Antimicrobial Susceptibility Testing

Susceptibility to 8 antimicrobial agents was tested using the agar dilution method according to the procedures of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)[22]. The antimicrobial agents tested were surotomycin, fidaxomicin, metronidazole, vancomycin, clindamycin, rifaximin, moxifloxacin, and tigecycline. Quality control strains included *C. difficile* ATCC 700057, *B. fragilis* ATCC 25285, *B. thetaiotamicron* ATCC 29741, and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. For in vitro testing of surotomycin, the medium was supplemented with 50 g/L Ca²⁺. Surotomycin quality control ranges were 0.125-1 µg/mL for *C. difficile* ATCC 700057 and 0.5-2 µg/mL for *S. aureus* ATCC 29213. Fidaxomicin quality control ranges were 0.06-0.25 µg/mL for *C. difficile* ATCC 700057. The reference MIC ranges of quality controls for the remaining antibiotics were those established by the CLSI. The breakpoints for antimicrobials were those established by the CLSI; when no breakpoint was available, recommendations for aerobic bacteria from the CLSI and other sources were used.

Also, susceptibility of metronidazole was determined on fresh isolates using E-test strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) and by disc diffusion (5 µg discs, Oxoid Basingstoke, United kingdom) in Brucella agar. Readings were performed after incubation for 48 hours at 37°C under anaerobic conditions.

4.2- Genotypic characterisation of the isolates.

It included the following phases:

4.2.1.- DNA extraction: was performed by means of Chelex Instagene Matrix (Biorad) resin in isolates of the strains of *C. difficile* grown in Brucella agar and incubated in anaerobiosis conditions. An aliquot of the DNA extracted was stored at -70°C until use.

4.2.2.- Detection of the genes of toxins A (tcdA), B (tcdB) and binary toxin (cdtA and cdtB) The genes of toxin A (tcdA conserved fragment, tcdA deleted fragment), toxin B (tcdB), and binary toxin (cdtA and cdtB) were detected using multiplex PCR with an internal amplification control following a method adapted from other authors [23, 24].

4.2.3.- Ribotyping. All the toxigenic strains (presence of any of the genes of the toxins) were characterized using PCR-ribotyping according to the procedure described by Stubbs et al. [25]. Phylogenetic analysis of ribotyping profiles was performed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and Dice coefficients (Bionumerics 5.0). The profiles of our isolates were compared with international ribotyping profile libraries. Ribotypes were named using the international designation. When the correspondence with

international ribotypes was unknown, the letter R followed by a number was used.

DEFINITIONS

A CDI episode was defined as the presence of a positive result for toxigenic *C. difficile* testing and the presence of diarrhea (≥ 3 unformed stools in 24 hours) or colonoscopic findings demonstrating pseudomembranous colitis.

The type of CDI episode according to the potential site of acquisition was defined according to the criteria of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for *Clostridium difficile* [26].

Patients with community-associated CDI were also stratified according to the level of healthcare exposure as outpatients or inpatients with no overnight hospital stay in the 12 previous weeks, as described by Chitnis et al [27]: no exposure, low-level exposure (outpatient visit with physician), high-level exposure (surgery, dialysis, emergency care visit, inpatient care with no overnight stay, or healthcare personnel dealing directly with patients).

Severity of CDI was defined according to the guidelines of the Society of Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA) for mild to moderate and severe CDI [1]; for severe complicated CDI, the definition was slightly modified.

Severe complicated CDI: CDI patients with septic shock, colectomy, megacolon, or CDI-related admission to the intensive care unit (ICU) within 7 days of the positive sample or CDI-attributable mortality.

Recurrent (R-CDI): After recovery from a previous episode (at least 3 days without diarrhea and clinical improvement), return of symptoms and positive stool sample separated from the former by between 15 and 60 days. Episodes

occurring more than 60 days after the previous one were not considered recurrences but new episodes that were not linked to the previous one.

CDI-associated mortality: Death not clearly attributable to other unrelated causes occurring within 10 days of the CDI diagnosis and/or due to well-known complications of CDI.

DATA ANALYSIS.

Data were analyzed using SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Qualitative variables appear with their frequency distribution. Quantitative variables are expressed as the median and interquartile range (IQR). Groups were compared using the Fisher exact test for categorical variables and the Mann-Whitney or *t* test for continuous variables.

A multivariate logistic regression model was used to assess risk factors for clinical underdiagnosis. Also, we built a multivariable logistic regression model to develop a combined clinical and microbiological prediction rule for poor outcome. Each predictor in the model was assigned a point proportional to its β coefficient. Scores for patients were calculated by summing the points for all the predictors present. The performance of the models was assessed using the receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the curve (AUC). The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the rule were calculated. Score cutoff values were determined by ROC curves, maximizing sensitivity while keeping acceptable specificity values. Validity values were calculated with a 95% CI following an exact binomial distribution.

A multivariate logistic regression model was used to assess the correlation between binary toxin and poor outcome. The odds ratio (OR) and

95% confidence interval (CI) were calculated. A p value <0.05 was considered significant.

5. Results

During the study period, 3,673 unformed stool samples from patients aged >2 years were processed for detection of toxigenic *C. difficile*. After exclusion of duplicate samples from an index case, 1,270 unformed stools (34.6% of all samples) were sent with no clinical request for toxigenic CDI testing.

We identified 249 episodes of CDI. Of these, 45 episodes (18.1%) were excluded because they did not fulfill the criteria for diarrhea (≥ 3 unformed stools/24 hours). Therefore, 204 CDI episodes met our inclusion criteria (CDI episodes in patients aged >2 years); of these, 178 had raised clinical suspicion and 26 (12.7%) had no clinical request for toxigenic *C. difficile* testing.

The rapid tests performed on the 178 cases that had raised clinical suspicion, were positive in 91.02% of the samples, the remaining 8.98% that were initially negative for the rapid tests were confirmed as positive by direct cytotoxicity and/or toxigenic culture.

Clinical characteristics and outcome of CDI episodes

Median age was 69.6 years, and 52.5% of patients were male. Overall, 78.9% of the patients were hospitalized at the time of the diagnosis of the CDI episode. Most cases (90.7%) involved a non-fatal underlying disease. The median Charlson comorbidity index in our study population was 2.0.

The most frequent risk factors were having received antibiotic treatment in the month prior to the CDI episode (85.3%), with a median number of 2.0

antibiotics and a median of 15 days of treatment, and having received proton pump inhibitors (77.9%). Other risk factors present in $\leq 21\%$ of the patients included nasogastric tube, mechanical ventilation, surgery, chemotherapy, dialysis, previous admission to a gastroenterology ward, inflammatory bowel disease, and previous isolation of methicillin-resistant *S. aureus*.

Thanks to systematic testing, we were able to detect a significant proportion (12.7%) of CDI episodes that would have gone undetected owing to lack of clinical suspicion if systematic testing had not been implemented. Most CDI episodes (83.8%) were considered mild to moderate. None of the strains corresponded to ribotype 027. Other microorganisms were present in only 5 cases (2.5%), as follows: *Campylobacter jejuni* (2), *Salmonella* (2), and rotavirus (1).

Most patients (84.3%) were treated for CDI. Of these, 85.5% were treated with metronidazole alone, 2.9% were treated with vancomycin alone, 7% were treated initially with metronidazole and later switched to vancomycin, 3.5% were treated with both metronidazole and vancomycin, 0.6% were treated initially with vancomycin and then switched to metronidazole, and 0.6% were treated with fidaxomicin. None of the patients required surgery for the CDI episode.

Of the 204 CDI episodes, 33 (16.2%) had a R-CDI. Only 1.5% of patients were admitted to the ICU in relation to the CDI episode. Overall mortality was 8.3%, and mortality attributable to CDI was 2.5%.

R-CDI episodes: clinical characteristics and comparison between R-CDI and non-recurrent CDI (non-R-CDI)

Of the 33 patients with R-CDI (16.2%), 23 patients (69.7%) had only 1 recurrence, 7 patients (21.2%) had 2 recurrences, 2 patients (6.1%) had 3 recurrences, and 1 patient (3%) had 4 recurrences.

The comparison between R-CDI and non-R-CDI revealed no differences in demographics, underlying diseases, comorbidities, risk factors, severity of CDI, analytical parameters, overall mortality, and CDI-associated mortality. The only differences observed were that R-CDI patients had a longer hospital stay after the CDI episode ($p<0.001$), a longer overall hospital stay ($p=0.025$), and more days of antibiotic treatment for CDI ($p=0.035$). We could not identify any early clinical markers to clearly predict R-CDI.

Types of CDI episodes according to potential site of acquisition

H-CDI accounted for 74.5% of cases (8.0 CDI episodes per 10,000 patient days); 18.6% were community-associated (23.9 episodes/100,000 inhabitants) and 6.9% were indeterminate.

Of the healthcare-associated cases, onset of symptoms was in the hospital in 85.5% and in the community in 14.5%.

When we compared C-CDI and H-CDI, we found that patients with C-CDI were younger ($p=0.002$) and more often had no underlying diseases ($p<0.001$). In addition, they had less malignancy ($p=0.017$) and cardiovascular disease ($p=0.041$) and a lower Charlson's comorbidity index ($p<0.001$). C-CDI patients less frequently received previous antibiotics ($p<0.001$), proton pump inhibitors ($p<0.001$), nasogastric tube ($p=0.032$), surgery ($p<0.001$), and mechanical ventilation ($p=0.005$).

C-CDI did not differ significantly from H-CDI in severity, although abdominal pain was a more common presentation in C-CDI ($p=0.005$), as was

more days of diarrhea ($p<0.001$). No differences were detected in the rate of R-CDI between C-CDI and H-CDI. All of the fatal cases were H-CDI; statistical significance was observed for overall mortality, but not for CDI-related mortality.

When assessing healthcare exposure in C-CDI as outpatients or inpatients with no overnight stay, we found that most of the C-CDI patients (65.8%) had a high level of healthcare exposure.

Suspected CDI (S-CDI) and non-suspected CDI (non-S-CDI) cases

We recovered 26 CDI cases that would have gone undiagnosed if the systematic testing of unformed stools had not been implemented (12.7% of all CDI episodes detected).

The comparison between non-S-CDI and S-CDI cases revealed that patients with a non-S-CDI episodes were younger (median age, 29.0 vs 72.2 years; $p<0.001$). The non-S-CDI patients' age ranged from 2.24-92.23 years, of which, 26.9% were aged ≥ 70 years, 15.4% were aged 69-40 years, 15.4% were aged 39-18 years and 11 patients were aged <17 years (42.3% paediatrics). Out of the non-S-CDI paediatrics, 54.5% were aged 2-4 years, 18.2% were aged 5-8 years, and 18.2% were aged 9-11 years old and one 16 year old patient (9.1%).

The S-CDI patients' age ranged from 3.26-92.30 years, of which, 53.4% were aged ≥ 70 years, 38.8% were aged 69-40 years, 5.1% were aged 39-18 years and 5 patients were aged <17 years (2.8% paediatrics). Out of the S-CDI paediatrics, 20.0% were aged 2-4 years, 40% were aged 5-6 years, 20.0% were aged 9-11 years old and one 16 year old patient (20.0%).

In addition, Non-S-CDI patients more frequently had no underlying disease (26.9% vs 2.8%; $p<0.001$), less frequently had underlying malignancy (3.8% vs 25.3%; $p=0.012$), and more frequently had gastrointestinal disease as

an underlying condition (23.1% vs 6.2%; $p=0.011$). Non-S-CDI patients also had a lower Charlson comorbidity index (0.0 vs 3.0; $p<0.001$).

Compared with S-CDI patients, non-S-CDI patients were more frequently C-CDI cases (65.4% vs 11.8%; $p<0.001$), had received fewer previous antibiotics (61.5% vs 88.8%; $p=0.001$) and proton pump inhibitors (30.8% vs 84.8%; $p<0.001$), and had less frequently been under mechanical ventilation before the CDI episode (0.0% vs 14.0%; $p=0.049$).

As for the CDI episode, abdominal pain was a more common presentation in non-S-CDI patients (60.0% vs 40.1%; $p=0.083$), and treatment for the CDI episode was less common (30.8% vs 92.1%; $p<0.001$). No differences were found for duration of diarrhea or severity of CDI between the groups.

Similarly, no differences were found for recurrence rate, poor outcome, or overall and related mortality.

We performed a multivariate analysis, in order to assess which clinical and epidemiological factors were independently associated with non-S-CDI, which included age, Charlson's comorbidity index, previous antibiotic, previous proton pump inhibitors, previous mechanical ventilation, malignancy, gastrointestinal disease and C-CDI. We found that C-CDI ($p<0.001$; OR= 10.892; 95% CI 3.872-30.642) and lower age ($p<0.001$; OR=0.958; 95% CI 0.939-0.977) were independently associated with clinical underdiagnosis.

The number of samples tested without clinicians request in order to recover a CDI non-suspected episode was 49.

Comparison of patients with and without poor outcome

Patients with a poor outcome were older than those without (median age, 74.7% vs 66.6; $p=0.032$), less frequently had a non-fatal underlying disease

(82.2% vs 93.1%; $p=0.040$), and had a higher Charlson comorbidity index (3 vs 2; $p=0.014$). We found no differences in the type of underlying condition except for malignancy, which was significantly more frequent in patients with a poor outcome (35.6% vs 18.9%; $p=0.026$). We found no significant differences in risk factors between the groups.

As for the CDI episode, there were no differences in pain, duration of diarrhea, or most probable site of acquisition of CDI. However, the CDI episode was initially more severe in patients with a poor outcome than in those whose outcome was favorable (31.1% vs 11.9%; $p=0.005$). Patients with a poor outcome had a significantly longer stay after the diagnosis of the CDI episode (16.0 vs 8.5 days) and a longer stay overall (34.0 vs 19.0 days).

At diagnosis, patients with a poor outcome had a lower lymphocyte count and a higher creatinine level and more frequently presented leukocytosis with a white blood cell (WBC) count $>15,000$ cells/ μ l ($p<0.05$). We found no significant differences between the groups for the remaining analytical parameters analyzed (hemoglobin, platelets, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and urea levels).

Eighty-one patients gave their consent for determination of levels of IgA and IgG antibody against *C. difficile* toxin A and B; no significant differences were found between R-CDI and non-R-CDI episodes regarding immunoglobulin levels.

Microbiological characteristics of *C. difficile* strains isolated

We recorded no significant differences between the groups with poor outcome and those without poor outcome for sporulation rate, germination rate, and metronidazole susceptibility ($p>0.05$). A positive cytotoxicity assay result was not associated with poor outcome.

A higher amount of toxigenic *C. difficile* (cfu per gram of stool) ($p=0.001$) and a higher amount of toxin per gram of stool ($p=0.004$) was detected in patients with a poor outcome. Findings were more frequently positive by EIA for patients with a poor outcome ($p=0.046$).

Clinical and microbiological predictors of poor outcome

The multivariable analysis to assess which clinical and microbiological factors were independently associated with a poor outcome revealed that the independent factors were advanced age, female sex, Charlson comorbidity index higher than 2, and the amount of toxigenic *C. difficile* (cfu per gram of stool) at diagnosis.

Clinical rule for prediction of poor outcome of CDI

In order to develop a clinical rule for predicting poor outcome in CDI, we built a multivariable logistic regression model using the following variables: female sex, age >60 years, Charlson comorbidity index >2 and leukocytes >15,000 cells/ μ l. For this assessment, and in order to eliminate any possible bias of CDI treatment on the clinical course of the episode, the cohort included only patients who had received appropriate treatment for CDI for at least 5 days and for whom complete data on all the proposed variables were available ($n=159$). The ROC curve for the combined clinical and microbiological rule yielded an AUC of 0.732 (95% CI, 0.630-0.835). Using the calculated score of > 5 for high risk of poor outcome, the sensitivity of the rule was 77.1% (95% CI, 60.98%-87.93%) and the specificity was 59.6% (95% CI, 50.47%-68.20%), with a PPV of 37.0% (95% CI, 31.34%-48.06%) and NPV of 89.5% (95% CI, 82.57%-96.37%). The diagnostic accuracy was 63.8% (95% CI, 56.04%-71.48%).

Microbiological predictors of poor outcome in CDI: a combined prediction rule

We designed a combined clinical and microbiological rule for prediction of poor outcome in CDI based on a multivariable logistic regression model using the following variables: female sex, age >60 years, Charlson comorbidity index >2, leukocytes >15,000 cells/ μ l, and toxigenic *C. difficile* >950,000 cfu per gram of stool. The ROC curve for the combined clinical and microbiological rule yielded an AUC of 0.774 (95% CI, 0.674- 0.875). Using the calculated score of >8 for a high risk of poor outcome, the sensitivity of the rule was 77.1% (95% CI, 59.86%-89.55 %) and the specificity was 70.2% (95% CI, 60.89%-78.38%), with a PPV of 44.3% (95% CI, 31.55%-57.55 %) and NPV of 90.9% (95% CI, 82.87%-95.98%). The diagnostic accuracy was 71.8 % (95% CI, 63.87%-78.42%).

Epidemiological and baseline characteristics of patients with CDI caused by a BT-positive strain and by a BT-negative strain

We detected 31 episodes (15.6%) caused by *C. difficile* strains with a BT gene. Five of the 31 episodes involved a coexisting strain which lacked the BT gene.

Out of the 31 episodes caused by strains with BT, 28 (90.3%) were ribotype 078/126, in 2 (6.5%) there was no correspondence with international ribotypes (R138 and R149), and 1 (3.2%) was ribotype 023.

Patients with CDI caused by a BT-positive strain were older than those with a BT-negative strain (median age, 76.3 vs 67.4 years; $p=0.042$). We found no differences in the type of underlying condition or Charlson comorbidity index. We did not find any significant differences in risk factors between the groups.

As for the CDI episode, no differences were found in the potential site of acquisition (community or healthcare setting). In both groups, most of the CDI episodes were mild to moderate (77.4% BT-positive vs 85.1% BT-negative; $p=0.292$), although 6.5% of the BT-positive episodes were severe complicated compared with 0.6% of the CDI BT-negative episodes. This difference was not statistically significant ($p=0.064$).

Comparison of outcome between patients with CDI caused by a BT-positive strain and by a BT-negative strain.

Patients with BT-positive strains presented a median of 1 more day of diarrhea (BT-positive median 4.0 days of diarrhea vs BT-negative median 3.0 days; $p=0.019$); however, there were no significant differences in overall days of hospital stay ($p=0.124$) or days of hospital stay after the diagnosis of the CDI episode ($p=0.488$).

We found no differences between BT-positive and BT-negative CDI episodes in terms of recurrence rate (16.1% vs 16.1%; $p=1.000$), overall mortality (9.7% vs 8.3%; $p=0.733$), or CDI-related mortality (0% vs 3.0%; $p=1.000$).

In order to determine the risk factors for poor outcome, we performed a bivariate analysis between the variables collected and poor outcome. All variables with a $p<0.05$ and the BT variable were included in a multivariate logistic regression model to assess their correlation with poor outcome. There was no association between BT and poor outcome ($p=0.701$; OR, 0.793; 95%CI, 0.243-2.591).

We also performed separate analyses for R-CDI, mortality, and CDI-related mortality. None of these analyses revealed any association with the presence of BT ($p>0.05$).

Comparison of the main ribotypes of *C.difficile* strains

The main ribotype corresponded to ribotype 001 (35.0%), followed by 078/126 (14.7%), 014 (12.2%), 106 (10.7%), 207 (4.1%) and other ribotypes, each present in less than 4% of the CDI episodes.

When analysing the epidemiological and clinical characteristics of patients with CDI according to the four major ribotypes of this thesis, we found no major differences between ribotypes in terms of age, sex, underlying disease prognosis. As for the type of underlying disease, patients infected with ribotype 001 were more often transplant recipients ($p = 0.013$), and nephrologic disease was present more frequently in patients infected with ribotype 014 ($p = 0.043$) than the rest of ribotypes .

As for the classic risk factors for CDI there were no statistically significant differences, except for the prior use of rifamycins which was associated with ribotype 001 infections ($p = 0.024$). There were no differences in terms of severity of the episode at the time of diagnosis and the evolution of the episode (adverse outcome, treatment failure, recurrence, and overall days of stay and post-CDI episode stay).

Regarding the place of acquisition, ribotype 001 was more frequently associated to health care-related acquisition ($p < 0.001$), while ribotype 106 was acquired more frequently in the community ($p = 0.033$) than other ribotypes.

Patients infected with ribotype 106 had a much lower Charlson comorbidity index than the rest of the major ribotypes, but had the highest duration of diarrhea.

As for microbiological characteristics, ribotypes 078/126 and 106 exhibited a higher amount of cfu /g of stool. Regarding toxin production, ribotypes 106 and 001 expressed a greater amount of toxin with an equal number of colonies.

Ribotype 001 presented the highest amount of toxin production per gram of stool. Ribotype 078/126 showed a greater sporulation and germination capacity than the remaining major ribotypes.

Outcome of CDI episodes according to the major *C. difficile* ribotypes

To determine the risk factors associated with CDI poor outcome, we performed a bivariate analysis between the collected variables and poor outcome. All variables with $p < 0.05$ and the variables of the four major ribotypes were included in the multivariable logistic regression analysis to assess its association with CDI poor outcome. No association between any major ribotype and CDI poor outcome ($p > 0.05$) was found.

Similarly, analysis were performed separately for recurrence, mortality and CDI associated mortality. None of these analysis revealed any association with any of the ribotypes ($p > 0.05$).

Molecular Characterization of R-CDI: Relapse and Reinfection

Out of the 33 R-CDI, molecular analysis could be performed on 30 of the episodes. We observed that 76.7% of the first recurrence episodes shared the same strain, at ribotype level, than the primary episode, and were therefore considered as relapses. The remaining 23.3% corresponded to reinfections. Those episodes with a second recurrence were mainly relapses (87.5%).

6. Discussion

The introduction of a systematic search for toxigenic *C. difficile* in all diarrheic stools arriving at a microbiology laboratory reveals a significant proportion of unsuspected cases and provides a more complete picture of the situation of CDI in a non-selected population. The main risk factors for lack of

clinical suspicion were community-associated CDI and young age. Our study shows also that CDI in a settlement with low prevalence of 027 strains behaves largely as a non-severe disease that is mainly healthcare-related and has a relatively low mortality rate.

Recent years have seen an increase in the overall incidence of CDI [4, 28-32] coinciding with outbreaks in Canada, the United States and Europe. However, more recent data from the United States and Europe suggest that this rise has come to an end [33, 34]. In our institution, the incidence of CDI had decreased from 10.7 cases/10,000 days of stay in 2003 to 8.3 cases/10,000 days of stay in 2012 (unpublished data). More recently, since 2013, coinciding with the study period of this study, an increasing trend has been observed from 8.9 CDI episodes/10,000 days of stay in January 2013 to 13.3 CDI episodes/10,000 days of stay in May 2014.

A decrease in disease severity has also been reported [35-37]. Consistent with the findings of other recent studies, we observed that most cases were mild to moderate [38-40]. Although reported mortality rates vary widely, the attributable mortality of CDI has traditionally been low (less than 2% of cases) [41-43]. Similarly, we found that only 1.5% of patients had to be admitted to the ICU because of CDI and that CDI-attributable mortality was 2.5% in our patients.

We observed recurrence in 16.2% of CDI patients, a finding that is consistent with commonly reported rates of approximately 20% [44, 45]. Many risk factors for R-CDI have been described [13, 38, 46, 47]; however, few prospective or validated studies have investigated clinical markers of recurrence [48, 49]. We were not able to demonstrate any early clinical predictors. Consequently, an accurate marker for prediction of R-CDI is necessary to identify high-risk

patients at diagnosis [49]. In our study, R-CDI patients did not have a higher risk for overall mortality or CDI-associated mortality, although they did have a longer hospital stay and received more days of antibiotic treatment for CDI.

CDI has been increasingly reported in the community [50-52], with incidences ranging from 7.7 to 29.5/100,000 inhabitants [53-57], and even 41% of all CDI episodes in one population-based study [55]. In our study, the incidence of C-CDI was 23.9/100,000 inhabitants, ie, 18.6% of all CDI episodes, a finding that is consistent with recently published data [27, 45, 57, 58].

However, when C-CDI patients were assessed for healthcare exposure as outpatients or inpatients without an overnight stay, we found that in 2 out of 3 episodes the patient had been heavily exposed to the healthcare system.

Chitnis et al. recently found that 82% of cases of C-CDI had some level of healthcare exposure in the 12 weeks before the episode and that only 18% had no exposure at all [27]. Consequently, we must ask whether we require a more complete definition of community-associated and healthcare-associated CDI.

C-CDI patients were younger and less frequently had underlying conditions, malignancy, and cardiovascular disease. They also had fewer comorbidities. Previous studies revealed similar findings in C-CDI patients [59] [58]. Known risk factors for CDI were less likely to be present in C-CDI patients than in H-CDI patients. In our study, 31.4% of C-CDI patients had not previously received antibiotics. Previous studies have shown even higher rates of C-CDI (approximately 60%) in patients with no previous exposure to antibiotics [59, 60].

Data on the outcome of CDI are usually generated by centers where *C. difficile* is not systematically sought in non-hospitalized patients, and the outcomes of these specific populations are not well known. We found that most

C-CDI episodes were mild to moderate, with severe CDI occurring in 8.3%. No fatal C-CDI episodes were detected; this finding is consistent with those of one of the few studies addressing non-hospitalized patients, which reported severe outcome in 6% of patients with a low 30 day-mortality of 1.6% [27].

In a recent Spanish nationwide study, we reported that 2 out of every 3 episodes went undiagnosed or were misdiagnosed owing to non-sensitive diagnostic tests or lack of clinical suspicion and request [61]. In our study, we recovered a significant proportion (12.7%) of CDI cases that would have gone undiagnosed owing to lack of clinical suspicion if systematic testing for toxigenic *C. difficile* in unformed stools had not been implemented.

This approach is clearly beneficial from the individual perspective of patients in whom a diagnosis of CDI has been confirmed and from the epidemiological perspective of infection control. Moreover, it can reduce the economic burden of CDI, which in Spain has been estimated at €3901 for initial infection, €4875 for first recurrence, and €5916 for second recurrence [62]. In our study, in order to recover a non-suspected CDI episode 49 samples without clinicians request for toxigenic *C. difficile* needed to be tested, which in our institution, has a cost of €735. Our approach seems to be cost-effective, since the diagnosis of CDI episodes triggers both infection control strategies (resulting in a reduction in the number of secondary CDI cases) and appropriate therapeutic interventions that can prevent costly complications.

Compared to patients with S-CDI, non-S-CDI patients were younger, less frequently had an underlying disease or malignancy as an underlying condition, and more frequently had gastrointestinal disease as an underlying condition. The higher percentage of patients with an underlying gastroenterological disease in the non-S-CDI group might reflect why CDI was

not suspected in the first place. Most non–S-CDI cases were C-CDI cases that lacked most of the known risk factors for CDI, suggesting that additional factors may contribute to infection. Abdominal pain was more common; however, severity of CDI and outcome were similar to those of CDI cases that had raised clinical suspicion. Risk factors for CDI underdiagnosis have not been previously reported, in our study we reveal that community CDI cases and young age were independently associated with lack of clinical suspicion.

In our institution, the outcome of CDI was poor in 22.1% of cases. Our clinical rule included advanced age, female sex, presence of comorbidities, and leukocytosis with a WBC >15,000 cells/ μ l as predictors of poor outcome. The rule was improved, especially in terms of specificity, with the incorporation of the microbiological marker of high number of toxigenic *C. difficile* (cfu). Our combined prediction rule includes prognostic markers of all unfavorable outcomes that could benefit from an early switch to other therapeutic options.

The clinical risk factors advanced age, presence of comorbidities, and leukocytosis with a WBC >15,000 cells/ μ l included in our prediction rule were in keeping with the findings of other investigators [48, 63-67]. Risk factors or clinical predictors described elsewhere (eg, proton pump inhibitors, lymphopenia, nasogastric tube, surgery, dialysis, previous admissions to the gastroenterology department, and previous isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) [38, 68-70] were either not associated with a poor outcome of CDI in our study or lacked statistical power and were therefore not included in our prediction rule.

Host factors (eg, impaired immune response) have been associated with increased risk for CDI or recurrence in several studies [16, 71, 72]. However, we found no correlation between poor outcome or R-CDI and antitoxin

antibodies. In the analysis by Hu et al., serum concentrations of IgG against toxin A were combined with clinical predictors of R-CDI, although they did not perform well in the validation cohort and did not serve to improve the prediction rule [48].

Several microbiological factors, such as sporulation and germination, play an important role in the pathogenesis of CDI [73, 74], and an association with severe CDI and R-CDI was recently reported [14, 75]. However, data remain limited and contradictory [14, 76]. In our study, higher sporulation and germination rates were not associated with poor outcome.

Expression of toxin is thought to be associated with the severity of CDI [77], and a correlation between fecal toxin levels and *C. difficile* counts has been reported in mice [78]. The findings of a study conducted by Leslie et al.[79], who compared *C. difficile* quantitation and toxin detection, suggest that quantitation of *C. difficile* could be used to predict toxin status. In our study, we found that the amount of toxigenic *C. difficile* (cfu) present at diagnosis was associated with poor outcome and possibly acted as a marker of the amount of toxin produced. Other microbiological factors, such as a positive result in the direct cytotoxicity test on stool, a positive EIA toxin test result, and toxin quantification using ELISA were not independently associated with poor outcome. One possible explanation could be that these variables are correlated with the amount of bacterial load and that the latter has a higher capacity for predicting poor outcome in CDI.

Existing prediction rules vary widely and focus on predicting recurrence [48, 68], disease severity [63, 80, 81], and mortality [64-66]. We propose a prediction rule that encompasses all the above unfavorable conditions in order to ensure timely and appropriate antibiotic therapy. One of the few prediction

rules for recurrence with reported validity values is that of Hu et al. [48, 80, 82], which yielded a sensitivity of only 54%. The sensitivity of our prediction rule was much higher (77.1%). Most prediction rules are based only on hospitalized patients [80, 82], whereas ours also included outpatients.

In our institution, CDI episodes caused by strains harboring BT genes accounted for 15.6% of the CDI episodes. None of the strains were ribotype 027; most strains with BT were ribotype 078/126. We found that the presence of BT genes was not associated with poor outcome.

Since the first description of BT by Popoff et al. [83] in 1988, the prevalence of BT-positive strains has been relatively low (6.4%) [84]. However, the outbreaks caused by *C. difficile* ribotype 027/NAP1/BI in Europe, Canada, and the United States revealed an increase in prevalence, which reached as much as 82% of all clinical isolates during the outbreaks [85-87]. In our study, the prevalence was similar to that reported for settings with a low prevalence of ribotype 027 [61, 88, 89].

The predominant ribotype of BT-positive strains was ribotype 078/126, which had been reported to be a “hypervirulent strain” [90]. Nowadays, the association between outcome and specific ribotypes is open to debate, and studies of the association with the so-called hypervirulent ribotypes 078 and 027 in non-epidemic settings revealed no association between specific ribotypes and disease severity [91, 92].

An association between disease severity and BT was described in 2 retrospective studies by Barbut et al. [88, 93]. However, we found no significant association between disease severity and BT. Another recent prospective study also failed to demonstrate a statistically significant association [94] between disease severity and BT.

The presence of the BT gene was recently linked to an increased risk of R-CDI [95]. We found that the frequency of recurrence did not vary (16.1%) in BT-positive and BT-negative CDI patients. Other recent studies have observed this lack of association between presence of BT and recurrence [94, 96].

In a retrospective registry-based study, higher case fatality was observed for patients with a BT-positive strain than for those with a BT-negative strain [97]. In our study, we found no differences between overall mortality of BT-positive and BT-negative CDI episodes. In fact, all cases of CDI-related mortality were recorded in BT-negative CDI patients. This finding is in line with the results published by Kim et al [94].

7. Conclusions

1. Our data demonstrates that part of the solution of the underdiagnosis of CDI is that laboratories should routinely perform screening of CDI in all diarrheic stool samples of patients over two years of age.
2. Our work shows that community CDI cases are reclassified in healthcare related cases following an assessment of their level of exposure to the healthcare system. This concept should be incorporated in the clinical practice guidelines definitions.
3. The concept of "poor outcome" created in our study, allows grouping patients who worsen during the process, who do not respond to treatment or who recur

one or more times. We consider this a more practical concept than recurrence for therapeutic decision choices.

4. Our study has faced the same limitations, as some previous studies, when it comes to obtaining a prediction rule for poor outcome based on clinical data present at the time of the diagnosis. However, we have demonstrated the improvement of the prediction rule when microbiological data shortly available are incorporated.

5. In a non ribotype 027 setting, it is not necessary to have different considerations in the clinical management of the patient based on the different non- 027 ribotypes since we have shown that there is no association between genotypic characteristics (including the presence of toxin binary) and the evolution of patients regarding different strains of non-ribotype 027.

6. Our molecular study has endorsed the recurrence definition used by us and subsequently adopted by the ESCMID. Most (76.7%) recurrences are caused by the same strain of the initial episode.

7. *C. difficile* strains circulating in our environment can be treated with traditional antibiotics such as metronidazole and vancomycin as well as with the novel antibiotics, fidaxomicin and surotomycin, since we did not find any antibiotic resistance in our antimicrobial susceptibility studies. In contrast, rifaximin should not be considered as an alternative treatment in our environment given the high resistance encountered in our study.

INTRODUCCIÓN

1. Perspectiva Histórica

Clostridium difficile fue descrito como causa de colitis asociada a antibióticos según los criterios de Koch en 1978 [98]. Los estudios previos que contribuyeron a esta observación incluyen tres líneas fundamentales de investigación: los propios de la bacteria, estudios sobre colitis pseudomembranosa y estudios de colitis asociada a antibióticos en modelo animal.

Clostridium difficile fue descrito por primera vez por Hall y O'Toole en 1935 como parte de la microbiota normal del intestino de recién nacidos, aunque en este momento fue denominado como *Bacillus difficile*, por su difícil aislamiento. Hasta tres años más tarde no fue renombrado como *Clostridium difficile*. Estos investigadores también lograron demostrar que producía una toxina que era extremadamente letal en ratones, siendo únicamente del orden de 10 a 100 veces menos letal que la toxina botulínica [99]. Sin embargo, no se consideró como un microorganismo de importancia biológica ya que no se relacionaba con un síndrome clostridial histotóxico. Esta impresión fue reforzada en posteriores estudios de Smith [100], en las que describió que *C. difficile* no presentaba unas características únicas en diversas localizaciones de infecciones extraintestinales. Estos autores no habían considerado el tracto digestivo.

La primera descripción de colitis pseudomembranosa (CPM) fue en 1893, por John Finley, el primer presidente de la Asociación de Cirujanos, que lo describió como un hallazgo de autopsia en una paciente del Dr. William Osler [101]. La paciente era una mujer de 22 años que fue sometida a la resección de un tumor gástrico el 26 de agosto de 1892, tras la cual desarrolló diarrea, que

fue haciéndose progresivamente más severa hasta su muerte, 15 días después de la operación. La autopsia reveló una “membrana diftérica” en el intestino delgado. Esta descripción, 40 años antes de la introducción de los antibióticos, indica la importancia de la cirugía abdominal, la hospitalización y las alteraciones de la motilidad intestinal en la patogénesis de la CPM [102].

La atención disminuyó hasta los años 50, cuando la CPM llegó a ser una complicación común del uso de antibióticos. En aquel momento se responsabilizó a *S. aureus*, ya que se encontraba en las heces de los enfermos, e incluso en las pseudomembranas y secciones de tejido intestinal. El tratamiento empleado en la enfermedad era la vancomicina, que estuvo disponible a partir de 1959. En 1960, Dearing y cols., fueron incapaces de aislar *S. aureus* en 11 de 18 pacientes con CPM, deduciendo que no todos los casos de CPM debían ser causados por *S. aureus* [103].

En los últimos años de la década de los años 60, la clindamicina se utilizaba de forma amplia para el tratamiento de infecciones anaeróbicas. Tedesco, un médico gastroenterólogo, del hospital de Barnes, en Saint Louis, observó un brote de casos de diarrea grave asociada al uso de clindamicina [104], en lo que parece de manera retrospectiva, el primer brote hospitalario de infección por *C. difficile*. Tedesco y cols.[104], realizaron un estudio endoscópico prospectivo que incluyó 200 pacientes que habían recibido clindamicina, 40 de ellos habían desarrollado diarrea y en 20 de estos se encontró CPM. Este estudio desencadenó una carta de precaución por parte de la FDA ("Food and Drug Administration") a todos los médicos en Estados Unidos, y llevó a un vigoroso intento de encontrar la causa de la CPM.

La mayor parte del trabajo encaminado a descubrir la etiología se realizó en modelos animales, en concreto en roedores, ya que prácticamente todos los

roedores desarrollaban la "cola húmeda" y cecitis letal con antibióticos. Los hámsteres parecían especialmente susceptibles [105, 106]; al recibir clindamicina, muchos de ellos morían a los 3-5 días. La clave decisiva para el papel de los clostridios histotóxicos era que presentaban en heces títulos elevados (10^{-5}) frente a una toxina que era neutralizada por la antitoxina de la gangrena gaseosa, lo que llevó a la asunción de que *C. sordellii* era el agente causal [106]. Sin embargo, no se encontró este agente en las heces de los animales ni de los pacientes, lo que llevó a una búsqueda de otros *Clostridium* que produjeran una toxina relacionada antigénicamente. Así, se describió *C. difficile* en 1978, en las primeras heces del noveno hámster (denominado 17HF1-9) [98].

El primer caso clínico confirmado, fue en un paciente de Los Angeles con colitis inducida por cefalosporinas, con un título de toxina de 10^{-5} , la paciente falleció por la CPM al día siguiente [98].

El test de la citotoxicidad se convirtió en la prueba estándar, aunque fue ampliamente sustituido por la incorporación de los enzimo-inmunoanálisis (EIA) en 1983 [107, 108]. Para mediados de la década de los 80 la infección por *C. difficile* (ICD) ya se había afianzado como una de las complicaciones más graves del tratamiento antibiótico. El tratamiento estándar era y sigue siendo el metronidazol y la vancomicina.

Apenas hubo nueva información acerca de la ICD hasta los años 2000-2002, cuando surgió una epidemia en Europa, Canadá y Estados Unidos por una cepa designada como NAP1/027/BI [85, 86, 109, 110]. En Estados Unidos, la tasa de infección se incrementó 3,5 veces y la mortalidad se cuadruplicó [5]. Esto trajo un sustancial interés de nuevo en la ICD, en concreto en su fisiopatología, prevención, detección y tratamiento.

2. Microorganismo y Patogénesis

Clostridium difficile es una especie bacteriana del género *Clostridium*, es un bacilo Gram positivo, anaerobio y esporulado (Figura 1). Las esporas son ovales y de localización subterminal, produciendo una deformación en la célula. Bajo el microscopio se ven como palillos de fósforos con el abultamiento localizado en un extremo terminal (Figura 2). El microorganismo en su forma vegetativa es altamente sensible a la presencia de oxígeno, mientras que en su forma esporulada es altamente termorresistente y capaz de sobrevivir en condiciones extremas (Figura 3).



Fig. 1: Tinción de gram de *C. difficile*



Fig. 2: Esporas subterminales de *C. difficile*

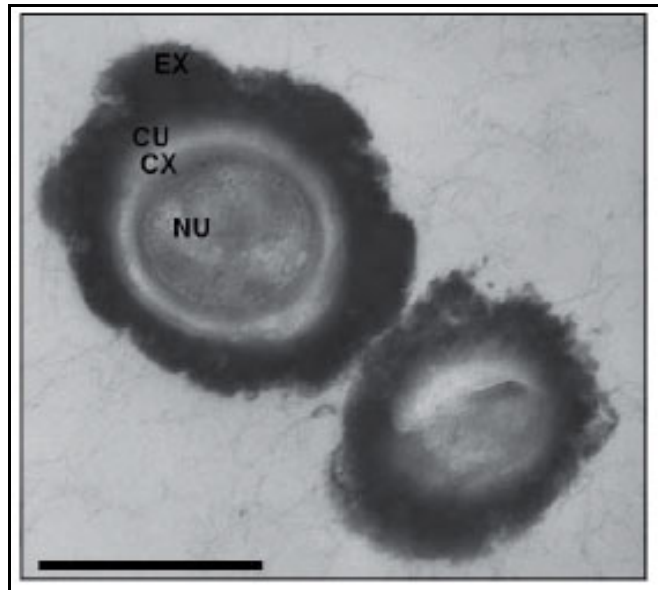


Fig. 3: Microscopía electrónica de transmisión de esporas de *C. difficile*. Se observa la ultraestructura de esporas de *C. difficile*: Ex, exosporium; CU, cubierta; CX, corteza de peptidoglicano; NU, núcleo de la espora. Barra negra: 500 nm.

Con respecto a su metabolismo, no produce lecitinasa ni lipasa, es indol negativo, y es capaz de hidrolizar gelatina. En cuanto a los carbohidratos, solamente fermenta la glucosa, aunque en ocasiones puede fermentar también el manitol. Sus principales productos metabólicos son el butirato y el acetato, y en menor cantidad también produce isobutirato, isovalerato, y ácido isocaproico [111].

Para entender los mecanismos por los cuales la bacteria causa infección, es necesario conocer la ecología del microorganismo y sus interacciones con la microbiota endógena del intestino, sobre todo del colon, en humanos. Esta microbiota incluye de 400 a 500 especies bacterianas pertenecientes a 30 géneros distintos. Más del 90% son anaerobias estrictas, y el ecosistema intestinal de adultos está dominado por los siguientes géneros: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, y *Lactobacillus*. Mientras que la composición de la microbiota colónica difiere significativamente de

persona a persona, ésta permanece estable a lo largo del tiempo en un individuo [112].

En general, los mamíferos nacen libres de microorganismos, y la microbiota se establece de manera gradual con el tiempo a través de una sucesión ecológica. Durante el proceso, un grupo de microorganismos domina sobre otro en intervalos sucesivos hasta la madurez. *C. difficile* coloniza más de un 50% de niños durante sus primeros meses de vida, permaneciendo éstos asintomáticos a pesar de la presencia de grandes cantidades de toxina. Cuando la microbiota madura, la población de *C. difficile* disminuye, hasta que prácticamente no se encuentra en adultos. El patógeno no puede establecerse en el intestino si la microbiota endógena está mantenida, por lo que se deduce que deben existir mecanismos de resistencia a la colonización de cualquier bacteria extraña por parte de la microbiota normal. En varios estudios realizados con la utilización de un quimiostato, se observó que las bacterias competían principalmente por los nutrientes y por los sitios de adhesión. En la microbiota colónica existe tal complejidad, que los nutrientes y los sitios de adhesión son muy reducidos, por lo que prácticamente ningún microorganismo nuevo puede establecerse. Las bacterias endógenas producen gran cantidad de sulfuro de hidrógeno y de ácidos biliares secundarios, con capacidad supresora de muchos microorganismos. Las grandes cantidades de ácidos grasos volátiles presentes en el colon, son también causantes de la inhibición de algunos microorganismos. En hámsteres, la disminución de *C. difficile* durante la maduración de la microbiota endógena, coincide con un aumento de ácidos grasos volátiles en el contenido fecal, aunque uno de estos ácidos grasos (el ácido butírico), es producido también por el propio metabolismo de la bacteria [112].

Con la inoculación de esporas y células vegetativas de *C. difficile* con un trazador inocuo en hámsteres, se ha visto que la mayoría de las células vegetativas se destruyen en el estómago, y sólo un 1% del inóculo pasa al intestino delgado. Las esporas, que son ácido-resistentes, pasan a través del estómago prácticamente intactas, y germinan en el intestino delgado después de la exposición primaria a ácidos biliares. Durante las dos primeras horas en el ciego, la viabilidad de las células vegetativas y las esporas germinadas disminuye uno o dos logaritmos.

Por lo tanto, se puede decir que la colonización por *C. difficile* está bajo el control de la microbiota endógena. La magnitud de la población bacteriana va a depender de la competencia microbiana que supone la microbiota normal, y la aparición o no de enfermedad dependerá del tamaño de la población, de la capacidad toxigénica, así como del resto de factores de virulencia de la cepa colonizadora, de los efectos neutralizantes de toxina del resto de la microbiota, y de factores relacionados con el huésped, como la edad o su grado de inmunodeficiencia [112].

El proceso de patogénesis en la diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) incluye: la alteración de la microbiota colónica normal por agentes antibióticos o antineoplásicos, la colonización por *C. difficile*, la producción de las toxinas A y B, y la aparición de daño e inflamación en la mucosa intestinal [103] (Figura 4).

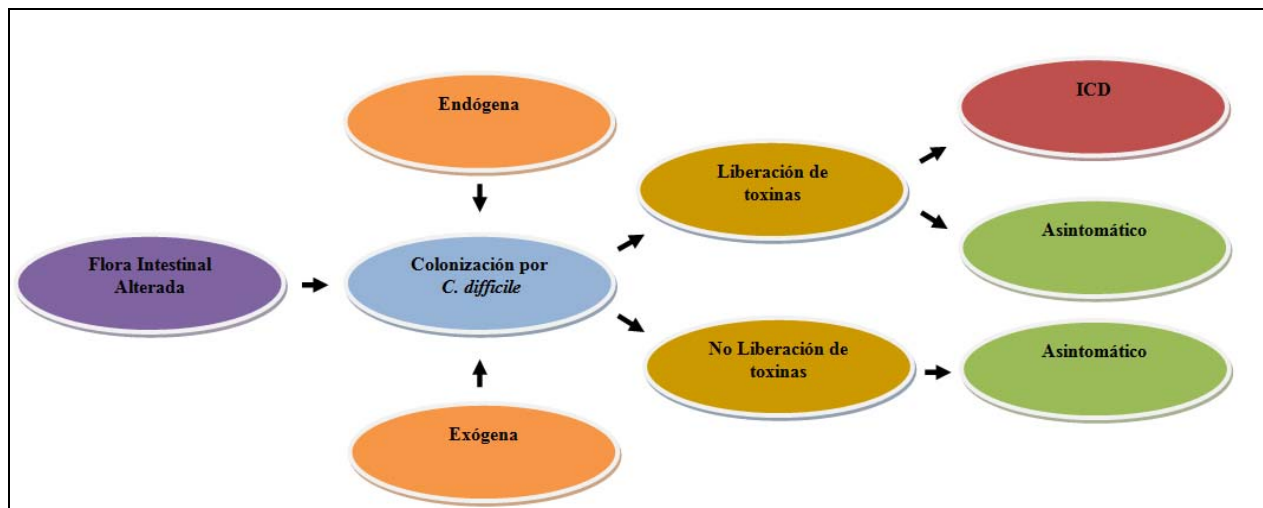


Fig.4: Patogénesis de la Infección Asociada a *C. difficile* (ICD)

Aunque los principales responsables de la virulencia de *C. difficile* son las toxinas que produce, existen otros factores que pueden favorecer la colonización de la bacteria, actuando indirectamente en la patogénesis, o incluso contribuyendo al daño tisular. Estos factores son: la producción de enzimas proteolíticas e hidrolíticas, la expresión de fimbrias y flagelos, la quimiotaxis y adhesión a receptores intestinales, y la producción de cápsulas. Las diferencias en la combinación de todos estos factores, son las que dan lugar a la variabilidad en la virulencia de las distintas cepas de *C. difficile* [113].

2.1. Enzimas

La mayoría de las cepas tienen actividad hialuronidasa, condroitín-4-sulfatasa y heparinidasa (actividad débil). También existe una débil actividad colagenasa, restringida a cepas muy virulentas. Estas actividades pueden estar implicadas en el daño intestinal, pues son enzimas degradativas de tejidos, pero además pueden ser utilizadas por la bacteria para la obtención de nutrientes [113].

2.2. Quimiotaxis

Se ha visto que la mucosa intestinal tiene un factor atractivo para *C. difficile*. Este factor es estable al calor y resistente a la proteólisis, y el grado de atracción se corresponde con el grado de virulencia de la cepa. La quimiotaxis es imposible sin motilidad, que para la mayoría de las bacterias es mediada por flagelos. Un estudio de purificación de la flagelina de distintas cepas de *C. difficile*, demostró que esta proteína tenía un Pm de 39 kDa y un 60% de similitud con el gen de la flagelina de *B. Subtilis* [113]. El gen (*fliC*), se expresa de forma distinta en algunas cepas, a pesar de no existir variabilidad de secuencia [114].

2.3. Adhesión

La adhesión al tejido del huésped es fundamental para la expresión de virulencia de la mayoría de patógenos. La adhesión de *C. difficile* al tejido intestinal se puso de manifiesto en 1979, con el análisis de una muestra de biopsia de un paciente con CPM. Según un estudio de Borriello *et al.*, en hámsteres, esta adhesión era mayor en las cepas más virulentas, y dentro del intestino, era mayor en el íleon terminal y en el ciego. No se ha demostrado que en el proceso de adhesión puedan intervenir las fimbrias o los flagelos, aunque existe presencia de fimbrias en algunas cepas, presentes en el polo de la célula. [113]. Se han realizado varios estudios para tratar de caracterizar las adhesinas de *C. difficile*, y en uno de ellos se descubrió la proteína Cwp66, que es la única proteína de superficie con propiedades adhesivas que se conoce hasta el momento [115]. Existen resultados contradictorios en cuanto a si las toxinas intervienen en la adhesión [113], [116]. En el proceso de adhesión también pueden intervenir las propiedades fisicoquímicas de los microorganismos, pues la carga positiva de la superficie hidrofóbica bacteriana,

puede interaccionar con las cargas negativas de las células del huésped [113]. Incluso las mucinas intestinales podrían intervenir retardando la adherencia del microorganismo, y una motilidad intestinal normal, podría reducir el tiempo disponible para la adhesión [117].

2.4. Cápsula

C. difficile requiere de la opsonización para su fagocitosis, lo que sugiere que puede existir un factor antifagocítico en la superficie celular. Al suprimir los carbohidratos de la superficie de la bacteria, no se altera el grado de fagocitosis, por lo que se piensa que pueda existir una cápsula de polisacáridos como factor antifagocítico [113].

2.5. Toxinas A y B

2.5.1. Locus de patogenicidad

Las toxinas A y B son las más importantes, y se han estudiado en profundidad, llegando a secuenciar sus genes. La toxina A es una enterotoxina de 308 kDa, y la toxina B es una citotoxina de 269 kDa. Estas toxinas se encuentran entre las toxinas bacterianas más letales estudiadas, y pueden actuar sobre más de 20 líneas celulares distintas de mamíferos [103].

La mayoría de las cepas producen las dos toxinas (cepas toxigénicas) o ninguna de las dos (cepas no toxigénicas), aunque últimamente se han descrito cepas en las que solo se detecta la toxina B (toxA-, toxB+) [118-120].

Las dos toxinas tienen una gran homología entre sí (mayor del 45% a nivel de aminoácidos) [103]. Las cepas no toxigénicas no producen enfermedad. En 1999, se descubrió una cepa no toxigénica llamada M90, que contenía los genes de las toxinas A y B. Al analizar el nivel de transcripción de

estos genes, se observó que era bastante inferior al de la cepa toxigénica de referencia. Por lo tanto, esto podría explicar su falta de toxigenicidad [121].

Los genes de las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*) se encuentran en un locus patogénico de 19,6 kDa (Figura 5). Cada gen tiene sus propios promotores y sitios de unión a ribosomas, aunque también pueden expresarse por un promotor común. En cepas no toxigénicas, el locus es reemplazado por 115 bases de ADN no codificante situado entre las dos secuencias de inserción: *cdu-2* y *cdd-3* [113].

Existe un pequeño marco de lectura abierta (*tcdD*) próximo al gen de la toxina B. Este gen codifica para un factor σ alternativo que está implicado en la transcripción de las toxinas, y que está afectado por la temperatura. La expresión de las toxinas es mayor a 37° C, lo que refleja una adaptación de la virulencia a huéspedes mamíferos [122].

Entre los genes *tcdA* y *tcdB* se encuentra otro marco de lectura abierta llamado *tcdE*. Recientemente se ha descrito que este gen es similar estructural y funcionalmente al de las proteínas “holin” (proteínas citolíticas de bacteriófagos que causan la muerte de las células huésped para liberar los nuevos fagos). Por lo tanto, se piensa que la función de este gen consiste en lisar la membrana de la bacteria para liberar al medio extracelular las toxinas, ya que éstas carecen de péptido señal, necesario para su secreción. Se cree que la bacteria se lisa para liberar sus toxinas, a la vez que se produce la esporulación [123]. Sin embargo, otro estudio demuestra lo contrario, pues detecta una alta producción de toxinas con escasa lisis y esporulación en la cepa VPI 10463 [124]. En este trabajo también se recoge la cinética de liberación de las toxinas A y B, que es mucho mayor en la fase estacionaria, y

se ve aumentada por una limitación de nutrientes. Además se describen otras proteínas liberadas junto a las toxinas.

El gen *tcdC*, que se transcribe en dirección opuesta, puede hacer una regulación a la baja de cada toxina. La transcripción de *tcdC* es muy alta en la fase exponencial del crecimiento de la bacteria, mientras que la transcripción de *tcdA-E* es alta en la fase estacionaria [113] [125].

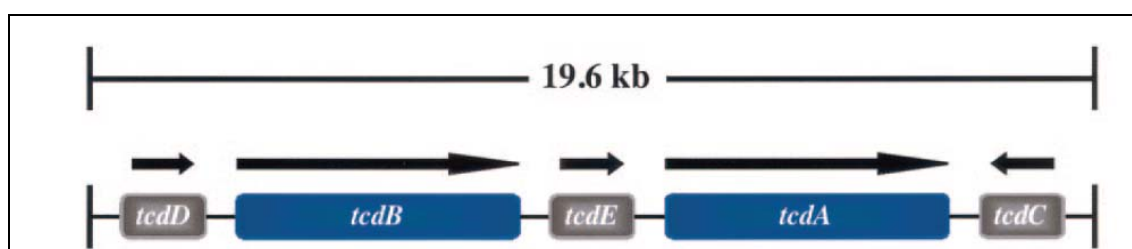


Fig. 5: Esquema del locus de patogenicidad (PaLoc)

Cohen y cols. concluyen que el locus de patogenicidad de *C. difficile* está muy conservado y es genéticamente estable en cepas toxigénicas normales. También se señala, que además de en los genes de las dos toxinas, pueden ocurrir cambios en otros genes del locus, explicando las características virulentas de algunas cepas. Spigaglia y cols., detectaron un 25% de cepas con alteraciones en el *tcdC*, para el que se describen 3 alelos distintos. Todas las cepas variantes tenían una elevada citotoxicidad, por lo que se piensa que la alteración del *tcdC* podría aumentar el nivel de expresión de las toxinas [126].

2.5.2. Actividad de las toxinas

Ambas toxinas, aunque la toxina B con mayor intensidad, tienen actividad monoglucosiltransferasa (glicosilación dependiente de UDP-glucosa), que cataliza la incorporación de glucosa en una gran variedad de sustratos, como las proteínas de unión a GTP (Rho, Rac y Cdc42Hs), implicadas en la

regulación del citoesqueleto de actina y en procesos de transducción de señales. Las dos toxinas glicosilan treonina en posición 37 en Rho. Al romper la actividad de estas proteínas, cambia la F-actina por G- actina, dando lugar a células redondeadas que son características de los efectos citopáticos observados [113]. Las proteínas Rho también regulan las uniones celulares. Por lo tanto, al inactivar estas proteínas, se produce la separación de las células epiteliales del intestino. Esto produce la ruptura de la barrera intestinal, aumentando la permeabilidad colónica, lo que da lugar a la diarrea típica de la enfermedad [127]. Las toxinas también inducen la liberación de mediadores proinflamatorios y citoquinas, así como la activación del sistema nervioso entérico, provocando la quimiotaxis de neutrófilos y la secreción de fluidos. [128].

La toxina A causa acumulación de fluidos e inflamación intestinal en varios animales, además de una grave destrucción de las microvellosidades, y tiene actividad hemaglutinante de eritrocitos de conejo [129]. Afecta a las neuronas del sistema nervioso entérico, liberando sustancia P. Esta sustancia activa a los mastocitos, produciendo un reclutamiento de neutrófilos y aumento de la secreción intestinal, produciendo inflamación [122]. Además, activa la liberación de calcio intracelular [129].

Aunque estudios previos indican que la toxina B no posee actividad enterotóxica ni en el intestino de hámsteres ni en conejos [130], un trabajo más reciente demuestra que existe inflamación intestinal y aumento de la IL-8 por parte de la toxina B, en un modelo de estudio que consiste en la inserción de tejido intestinal humano en ratones inmunodeficientes. Esta discrepancia podría deberse a la falta de receptores para esta toxina en el intestino de estos

animales [131]. Además, la toxina B es más agresiva “in vitro” en el epitelio colónico humano [118], [129].

Por otra parte, las dos toxinas parecen actuar sinérgicamente. [118] [132]. Las dos toxinas necesitan para su actuación, la internalización celular, la exposición intracelular a bajos pHs, y la activación enzimática [132] [133].

En humanos y roedores, la toxina A se une a receptores de carbohidratos que contienen galactosa-beta-1,4-N-acetilglucosamina [130] [134]. Tres antígenos de origen hidrocarbonado llevan esta estructura de unión a la toxina A (Lewis I, X, e Y), los cuales existen en el epitelio intestinal humano, aunque no se expresan universalmente en células colónicas epiteliales. En un estudio de Rolfe y cols., se purificó un receptor de la toxina A del intestino delgado de crías de hámsteres. Se detectó así que este receptor era similar al de los adultos, que la unión a la toxina A aumentaba con la temperatura, y que la unión era inhibida por tiroglobulina bovina y por lectinas [134]. No se conoce ningún receptor para la toxina B, aunque se ha visto que las dos toxinas se unen a los ácidos nucleicos [103].

2.5.3. Estructura de las toxinas

Existen tres dominios funcionales en ambas toxinas (Figura 6):

- El extremo N-terminal, que contiene las actividades citotóxicas y enzimáticas.
- El extremo C- terminal, que contiene la zona de unión al receptor, y está compuesto de elementos repetitivos.

- La sección media, que incluye un dominio transmembrana, que se cree que es el responsable de la translocación de la toxina al citosol [127].

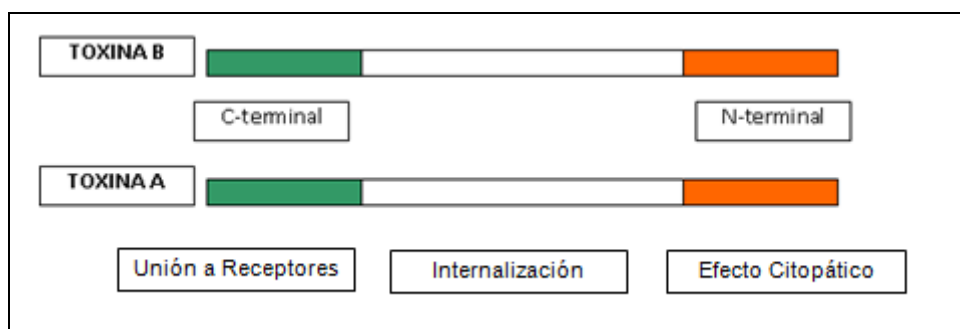


Fig. 6: Estructura de las toxinas A y B

2.5.4. Cepas toxA-, toxB+

La primera cepa toxA-, toxB+, se descubrió en 1991, y se vio que causaba enfermedad en modelos animales, con una toxina B muy potente. A esta cepa se le llamó CCUG 8864, y se detectó que tenía una gran delección de 6 Kb, en el extremo 3' de secuencias repetidas del gen de la toxina A [135]. En 1993 se encontró un segundo tipo de cepa llamada F1470, que no era virulenta en modelos animales, y se aislaba comúnmente en niños asintomáticos. Esta cepa tenía una delección de 1.7 Kb en la misma zona que la anterior. Esta zona de secuencias repetidas es la que codifica los epítopes para los anticuerpos usados en el EIA (Enzimoimmunoensayo) [136] .

Posteriormente se descubrió que estas cepas tenían un efecto citopático similar al de la toxina letal de *C. sordellii*, y distinto de las cepas toxigénicas normales de *C. difficile*, pues no producían hileras (Fig.7). Esto podría deberse a una alteración de secuencia hallada en la proximidad del sitio activo de la toxina B. También se observó que ambas tenían un espectro de glicosilación

aumentado que incluye a las proteínas Ras. En la toxina de *C. sordelli* existe una región que reconoce la proteína Ras como sustrato. Por todo ello, se pensó que las cepas 1470 y 8864 producían una toxina híbrida [137], [119].

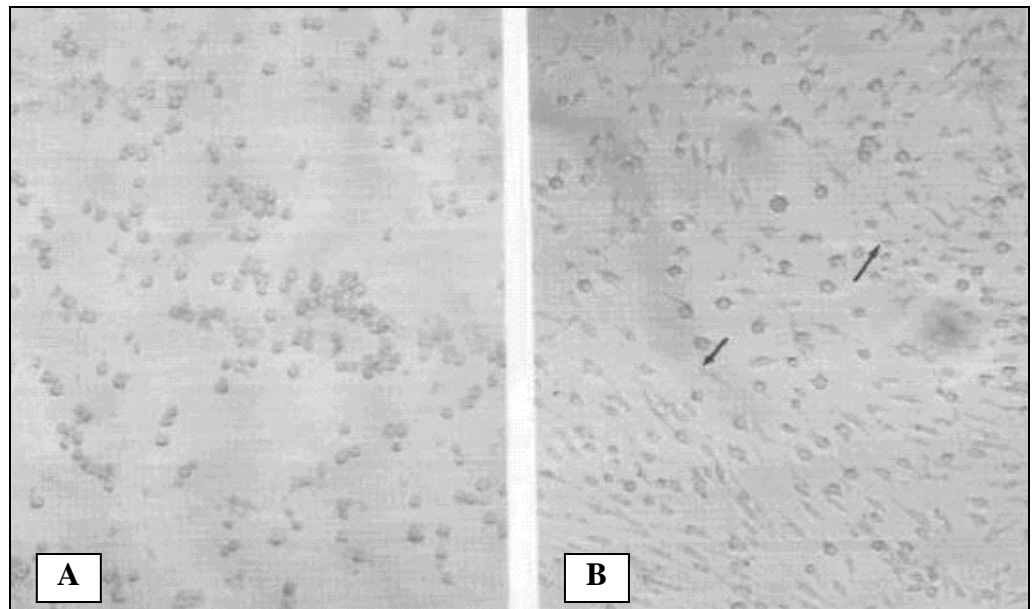


Fig. 7: Efectos citotóxicos causados por una cepa A+ B- (A), y por la cepa de referencia 10463 (B). En (A) no se observa la formación de hileras [118].

En un estudio de la cepa 8864, se detectó una inserción de 1.1 Kb entre los genes *tcdE* y *tcdA*, que codificaba para una proteína de 181 aminoácidos sin homología con ninguna proteína conocida. Esta inserción tenía un marco de lectura abierta de 543 pb al que se llamó *tcdF*, y se transcribía. Los autores pensaron que la función de este nuevo gen podía ser la compensación por la pérdida de unión al receptor de la toxina A en este tipo de cepas [138].

Existen varios ejemplos de brotes nosocomiales causados por cepas de este tipo, exhibiendo el rango de síntomas clásicos de la enfermedad, desde leves diarreas hasta colitis pseudomembranosa y muerte [118] [139].

La prevalencia de estas cepas varía de unos países a otros, encontrando tasas del 0.2% en E.E.U.U., 2.5-3% en Francia y Gales, y del 12%

en Japón. Katoy cols., estudiaron la prevalencia de esta cepa en tres hospitales de Japón, usando cebadores para PCR de ambas toxinas. De 243 aislados, 143 fueron toxigénicos, y 47 fueron toxina A-negativo, toxina B-positivo [140]. La mayoría pertenecen al serotipo F (cepa 1470), aunque posteriormente se han descrito nuevos serotipos. Las cepas del serotipo F están ampliamente distribuidas por el mundo, y no muestran mucha variabilidad genética. Al contrario de lo que se pensaba al inicio de su descubrimiento, son cepas patogénicas [141], [142].

2.5.5. Cepas variantes

En 1998, Rupnik y cols., caracterizaron 10 toxinotipos según las alteraciones de varias regiones de los genes toxigénicos (toxinotipos del I al X), con respecto a la cepa de referencia 10463. En ellos se incluía la cepa 1470 (toxinotipo VIII), y la cepa 8864 (toxinotipo X). Excepto éstos, los demás toxinotipos tenían una toxina A detectable por EIA [143]. Posteriormente se describieron nuevos toxinotipos, hasta llegar a 20 [144], [120]. Las alteraciones detectadas en estas cepas pueden ser: polimorfismos en sitios de restricción en ambos genes, o deleciones en el gen *tcdA*, observándose las mayores diferencias en los fragmentos A3 y B1, según un patrón de reacciones de PCR [145].

Recientemente se han estudiado 15 de estos toxinotipos, observando que 12 de ellos tenían una deleción en el extremo 3' del gen de la toxina A, aunque sólo 5 de estos toxinotipos eran toxina A- según los inmunoensayos (VIII, X, XI, XVI, y XVII). También detectaron una menor producción de toxina A y menores títulos de citotoxicidad en los 12 toxinotipos, con respecto a la cepa de referencia VPI 10463. Cualitativamente, la citotoxicidad era la misma a la de

referencia, excepto en tres toxinotipos, cuyo efecto era similar al de las cepas A-, B+ (IX, XIV, XV) [146].

2.6. Toxina binaria

Además de las toxinas A y B, también se ha descrito una nueva toxina, con actividad ADP-ribosil transferasa específica de actina [83]. Esta nueva toxina, a la que se ha llamado CDT o toxina binaria, tiene dos componentes (Figura 8) [147]:

- ***cdtA***: componente enzimático, que cataliza la ADP-ribosilación de actina monomérica e induce la desorganización del citoesqueleto.
- ***cdtB***: componente de unión y translocación, que reconoce un receptor celular, permitiendo la internalización del componente enzimático.

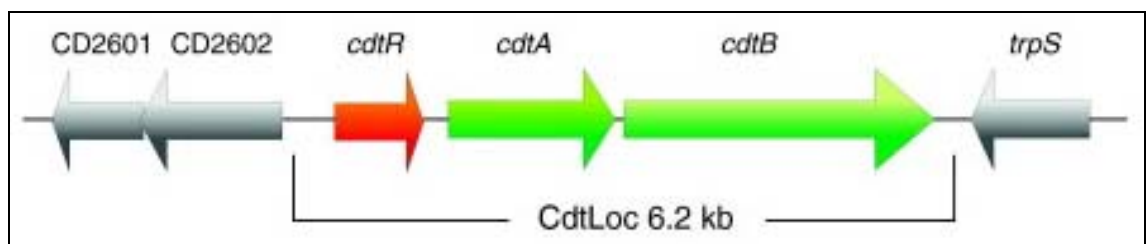


Fig. 8. Estructura de la toxina binaria de *C. difficile*

Aunque la mayoría de las cepas productoras de toxina binaria contienen los dos genes, se han descrito cepas que poseen sólo el gen *cdtB*. Ambos genes se transcriben en el mismo sentido, y están separados por una región de nucleótidos no codificantes [147]. Son genes cromosómicos, aunque no están

unidos al PaLoc [148]. Estos genes han sido parcialmente secuenciados, detectando alguna variabilidad entre cepas [149].

La primera cepa descrita como productora de toxina binaria se denominó CD196, y se descubrió en 1988. La toxina CDT se relaciona con otras toxinas binarias de *Clostridium*, que incluye la toxina lota de *C. perfringens* tipo E, la toxina de *C. espiriforme*, y la toxina C2 de *C. botulinum* C y D. La producción en cultivo de los dos componentes *cdtA* y *cdtB*, es 40 veces menor que la de la toxina lota de *C. perfringens*. [147]. En un estudio posterior se describió que el extremo N-terminal de *cdtA* se une a *cdtB*, mientras que el extremo C-terminal contiene la actividad enzimática. Además se identificaron los residuos de aminoácidos indispensables para su actividad [150].

La toxina binaria es citotóxica en cultivos celulares, necesitando tripsina para su activación, aunque no se sabe cómo funciona en el intestino humano [147]. Las alteraciones causadas en las células incluyen el redondeamiento celular y la despolimerización de los filamentos de actina [150].

Se detecta en un 1,6-12,5% de aislados, y solamente en cepas que tienen alguna variación en los genes de las toxinas (cepas variantes) [149], [120], [151]. La posesión de toxina binaria se correlaciona bien con el toxinotipo y el ribotipo. Las cepas del serotipo F no tienen toxina binaria [149]. En un estudio de detección de toxina binaria en cepas no toxigénicas, se encontró un 2% de aislados que contenían ambos componentes *cdtA* y *cdtB*, y éstos pertenecían tanto a pacientes sintomáticos como asintomáticos [148].

Según la dotación de toxinas descritas, los aislados de *C. difficile* se podrían clasificar en seis grupos [149]:

- Aislados que poseen toxina A y toxina B.

- Aislados que poseen toxina A, toxina B, y toxina binaria.
- Aislados que poseen sólo toxina B.
- Aislados que poseen toxina B y toxina binaria.
- Aislados que poseen sólo toxina binaria.
- Aislados que no poseen ninguna toxina.

3. Epidemiología

3.1 Humanos

En la última década, la epidemiología de la ICD ha sufrido un cambio dramático, con un incremento del número de casos y de gravedad de la infección en Estados Unidos, Canadá y Europa [4, 28, 29, 152]. *C. difficile* es la causa más común de diarrea hospitalaria, llegando a suponer hasta un 30% de los casos [153, 154]. Así mismo, ha llegado a sustituir a *S. aureus* resistente a la meticilina (SAMR) como la causa más frecuente de infección hospitalaria [155]. Esto se traduce en 300.000 nuevos casos diagnosticados al año en Estados Unidos [156].

En Estados Unidos la tasa de altas hospitalarias con diagnósticos de ICD se incrementó de 3,82/1.000 altas en el año 2000 a 8,75/1.000 altas en el año 2008, con un aumento desproporcionado de los pacientes mayores de 65 años[157]. Un estudio llevado a cabo en Michigan, reveló que los casos de ICD se duplicaron en un periodo de seis años (2002-2008) [158]. En el año 2009, las tasas de ICD hospitalario parecen haberse estabilizado, Lucado y cols. comunicaron una disminución en el número de casos [157]. Un total de 336.600 estancias relacionadas con la ICD se documentaron en 2009, representando el 0,9% de todas las estancias hospitalarias de Estados Unidos. En el 67% de

estas estancias hospitalarias, la ICD fue listada como segundo diagnóstico. Los pacientes afectados mayores de 65 años supusieron las dos-terceras partes de los pacientes con ICD. Las mujeres presentaron tasas más elevadas de estancias hospitalarias que los varones. Desde que se implantaron unas medidas de control de la infección más exhaustivas en 2007-2009 , se ha observado una disminución también en Inglaterra [159].

El reciente cambio en la epidemiología también ha supuesto la emergencia de la ICD en poblaciones que se consideraban de previamente de bajo riesgo para la ICD, como lo son los casos graves en mujeres periparto. También se ha descrito un incremento en niños y personas consideradas sanas sin contacto con el sistema sanitario [50].

Durante este periodo de creciente incidencia de la ICD, hubo también un incremento en la gravedad de la ICD, con mayor número de comunicaciones a cerca de complicaciones de la ICD y de casos de mortalidad relacionada con la ICD.

En la información transmitida de los brotes hospitalarios de Quebec, Canadá y posteriormente de Estados Unidos, se describió un alto número de casos graves asociados a un mayor número de colectomías, fallos terapéuticos y muertes, como no había sido visto hasta el momento [86, 87, 160].

Respecto a la mortalidad atribuible, en Estados Unidos, los datos de número de muertes certificadas como primera causa por enterocolitis debida a *C. difficile* se incrementaron casi 10 veces en el periodo 1999 a 2008, pasando de 793 muertes en 1999 a 7.483 muertes por ICD en 2008. En 2009, el número de muertes disminuyó ligeramente a 7.285 (descenso no estadísticamente significativo). La tasa de muertes ajustada por edad sí tuvo una disminución de 2,3 muertes por 100.000 en 2008 habitantes a 2,2 por 100.000 en 2009,

suponiendo un descenso del 4%. En 2009, el 92% de las muertes ocurrieron en pacientes mayores de 65 años y *C. difficile* fue la decimonovena causa de muerte en este grupo de edad [161].

La experiencia canadiense merece ser resaltada en relación con la aparición de la cepa 027. En 2004, Pépin y cols. comunicaron un incremento de los casos en la población general de 36 a 156 por 100.000 habitantes entre los años 1991 y 2003 [162]. En 2005, Loo y cols. comunicaron los resultados de un estudio prospectivo de vigilancia de 12 hospitales situados en Quebec, en los que la incidencia pasó de 6 casos a 22,5 por 1000 ingresos [87]. La tasa de mortalidad a los 30 días de la ICD hospitalaria en hospitales de Quebec se situó en un 6,9% [87]. Esto supuso un aumento 4 veces superior respecto de la media canadiense de 1,5% en 1997 [42]. Estos dos estudios sembraron la alarma y pusieron el foco de atención en el incremento significativo de casos y en la mortalidad asociada a la aparición del ribotipo 027. A pesar de estos incrementos, parece que el número de casos se ha estancado recientemente, probablemente atribuido a las medidas de prevención adoptadas por la comunidad hospitalaria.

Como se ha mencionado anteriormente, este cambio en la epidemiología de la ICD, se ha atribuido a la cepa relacionada con los brotes de Europa, Canadá y Estados Unidos [85-87]. La cepa epidémica designada como NAP1/027/BI. Varias características de esta cepa pueden haber contribuido a su hipervirulencia y a su fácil diseminación. En primer lugar, la cepa presenta una mutación en un regulador negativo de la producción de toxina *tcdC*, lo cual supone un incremento de la producción de toxina respecto de otras cepas [163]. En segundo lugar, la presencia de una tercera toxina, la toxina binaria [86], aunque su papel en la ICD todavía no está del todo claro. Por último, la

resistencia a fluoroquinolonas de esta cepa, parece haber contribuido a su exitosa diseminación en el ambiente hospitalario [86]. A pesar de lo cual, existen cepas 027 existentes previas al brote que no presentan esta resistencia, y estudios recientes han demostrado que la esporulación de estas cepas no parece ser superior al resto [76].

3.1.1 Cambios en la Epidemiología en Europa

Los primeros datos amplios de incidencia de la ICD en Europa, se recopilaron en un estudio en 2002 por el Grupo Europeo de Estudio de *C. difficile* (ESGCD), en el que participaron 212 hospitales, del Reino Unido, Francia, Bélgica, Dinamarca, Alemania, Italia, Holanda y España [164]. La incidencia de la ICD varió considerablemente entre los centros, dependiendo en parte de la metodología diagnóstica utilizada. La mediana de la incidencia fue de 11 casos por 10.000 ingresos.

En 2005, el ESGCD realizó un segundo estudio de vigilancia de dos meses en 38 hospitales de 14 países [89]. Todos los pacientes ingresados con ICD fueron incluidos, la mediana de la incidencia fue de 2,45 casos por 10.000 pacientes día, aunque varió de 0,13 a 7,1 casos/10.000 pacientes día. En total 354 aislados toxigénicos de *C. difficile* fueron analizados, se encontraron más de 66 ribotipos distintos y su distribución variaba de forma marcada entre hospitales y los distintos países. El ribotipo más común fue el 001 (13%), seguido del ribotipo 014 (9%); los ribotipos 002, 012, 17 y 027 se hallaron en un porcentaje del 6% de cada uno de ellos, mientras que el ribotipo 078 represento un 3% de los aislados. En este estudio las cepas 027, se encontraron en Irlanda, Bélgica y Holanda. Los pacientes infectados con el ribotipo 027, presentaron una mayor gravedad.

En el periodo de Octubre del 2003 a Junio del 2004, sucedió el primer brote de 027 en el Reino Unido, en el hospital Stoke Mandeville, con 174 casos y 19 muertes (11%) que fueron directamente o probablemente debidas a la ICD [165]. Un segundo brote tuvo lugar en el mismo hospital entre Octubre de 2004 y Junio del 2005, con 160 nuevos casos y 19 (12%) muertes. La comisión de investigación del sistema sanitario del Reino Unido, concluyó que los brotes habían sido fruto de la falta de medidas de control de la infección, la falta de instalaciones adecuadas para el aislamiento de los pacientes y la falta de prioridad que se le había dado [166].

Desde el año 2004, en Inglaterra la declaración de casos de la ICD es obligatoria, y los datos cuatrimestrales se hacen públicos. Tras años de subida constante, desde la introducción en 2007 de un sistema de vigilancia más potente, ha habido un marcado descenso del número de casos. La tasa de muertes en Inglaterra y Gales, se había cuadruplicado en el periodo 2004 a 2007 mientras que en 2008 hubo un descenso del 29% [167]. Esta disminución parece que es debida al control del ribotipo 027.

En Julio del 2005, se produjo un brote de ICD por el ribotipo 027 en Holanda [168, 169]. El reconocimiento de este brote fue debido al agrupamiento de casos graves de ICD y al rápido incremento de casos de 4 a 83 por 10.000 ingresos de Abril a Julio del 2005. El brote cesó solo tras la implementación de un uso restringido de cefalosporinas y a una prohibición total de las fluoroquinolonas, además de las medidas de higiene generales, el aislamiento de los pacientes, la educación del personal sanitario y un intenso programa de limpieza [170].

Una actualización de la diseminación en Europa del ribotipo 027 fue publicada en 2007 [20], para entonces el ribotipo 027 había afectada a 11

países de la Unión Europea. De manera interesante, en Holanda y Francia, la tasa de mortalidad asociada a este ribotipo fue menor (6,3% y 4%, respectivamente) que el comunicado por Estados Unidos y Canadá [86, 87, 162, 171].

En 2007, en España, una paciente trasladada de un hospital de Reino Unido, fue ingresada en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid, con ICD por ribotipo 027 [172]. A pesar de que no hubo una diseminación de esta cepa, una técnico de laboratorio embarazada, que trabajaba con esta cepa adquirió la infección.

Para el año 2008, el ribotipo 027 estaba presente en 16 países de la Unión Europea y había causado brotes en Bélgica, Alemania, Francia, Irlanda, Luxemburgo, Holanda, Suiza y el Reino Unido [20].

En el primer estudio nacional español en 2008, la incidencia de ICD relacionado con la asistencia sanitaria (H-ICD) fue de 3,8/10.000 pacientes día y la incidencia de ICD comunitario (C-ICD) fue de 23,6/100.000 habitantes. Los datos del segundo estudio nacional llevado a cabo en 2013, muestran una incidencia de H-ICD fue de 6,5 casos/10.000 pacientes día y una incidencia de C-ICD de 22,3/100.000 habitantes [173]. Recientemente, se ha publicado el primer caso autóctono de ribotipo 027 en España [174].

3.1.2 Infección Comunitaria (C-ICD)

Históricamente, las tasas de C-ICD han sido bajas, oscilando entre 3,2 a 16,2/100.000 habitantes [175, 176]. La C-ICD parece estar sufriendo un incremento [50-52], con incidencias que van de 7,7 a 29,5/100.000 habitantes [53-57]. En un estudio realizado sobre 10.342 casos de ICD [177], el 32% eran C-ICD, ligeramente superior a otros porcentajes comunicados de C-ICD que se

sitúan en torno al 20-27% [178, 179]. La tasa de recurrencia de la C-ICD descrita oscila desde un 9% hasta en un 28% [177, 180].

Bauer y cols. describieron tres posibles causas de C-ICD: la colonización del tracto gastrointestinal de pacientes que habían sido dados de alta de un hospital de manera reciente, el incremento de la diseminación en los hospitales ha llevado a un incremento en la tasa de portadores asintomáticos en la población y el contacto con portadores asintomáticos [51]. También se ha sugerido que el reservorio animal y la comida contaminada pueden jugar un papel importante en el incremento de casos de C-ICD [181].

Los factores de riesgo de la C-ICD no se han investigado bien en profundidad. A pesar de que los antibióticos son unos de los factores de riesgo más conocidos para la C-ICD, se han descrito casos de C-ICD sin exposición previa a antibióticos. La adquisición de *C. difficile* durante el tratamiento antimicrobiano parece ser frecuente en la comunidad (tasa estimada de 2,700 casos por 100.000 exposiciones a antibióticos[182]. Sin embargo, la vigilancia prospectiva de la C-ICD y un estudio de casos-contróles en dos cohortes de pacientes distintos mostró que casi la mitad de los casos no habían recibido tratamiento antibiótico en el mes previo a la detección del episodio de ICD [57].

Este hecho pone de relevancia la existencia de otros factores de riesgo potenciales para la ICD. Un modelo de regresión logística para las causas de la C-ICD encontró 6 factores de riesgo significativos: uso de clindamicina, penicilinas, alteraciones gastrointestinales, número total de antibióticos recibidos, número de ingresos previos y número de comorbilidades [59].

El uso de medicación que suprime la secreción ácida del estómago, en particular los inhibidores de la bomba de protones (IBP), se han asociado a un riesgo mayor de C-ICD en algunos estudios[60]. La secreción de ácido gástrico

es clave en el mecanismo de defensa del huésped frente otras infecciones gastrointestinales, y estudios epidemiológicos y en animales han demostrado una asociación entre la C-ICD y los IBP. Las células vegetativas rápidamente mueren a un pH gástrico normal, sin embargo al pH que se encuentra en pacientes que reciben IBPs, pueden sobrevivir. Se ha demostrado recientemente, que las células vegetativas pueden sobrevivir el suficiente tiempo en superficies húmedas en las que la transmisión puede ocurrir [183]. La habilidad de las formas vegetativas de *C. difficile* en superficies húmedas y en contenido gástrico a un pH elevado sugieren un potencial mecanismo por el que los IBPs pueden incrementar el riesgo de adquirir ICD. Sin embargo, existen otros estudios en los que los IBPs no son más frecuentemente recibidos en los casos de C-ICD [57].

En 2005 varios casos de ICD graves se registraron en mujeres jóvenes (mediana de edad de 26 años) y sanas en Norte América. El 24% de estas pacientes no había recibido tratamiento antibiótico en los tres meses previos al diagnóstico de ICD. Una mujer de 31 años, embarazada de 14 semanas, acudió al servicio de urgencias tras tres semanas de diarrea. La paciente había recibido en los tres meses previos únicamente trimetoprim sulfametoxazol por una infección urinaria, fue tratada con metronidazol y dada de alta, aunque continuó con una colitis grave. La paciente fue reingresada, tuvo un aborto espontáneo y murió en el tercer día de ingreso. La histopatología del colon demostró colitis pseudomembranosa [50]. Los casos periparto descritos en mujeres en Estados Unidos[50], han llamado la atención sobre este grupo de pacientes. Sin embargo, parece que estos casos aún representan un bajo porcentaje (1%) de la C-ICD[177].

La transmisión de *C. difficile* de animales y comida a humanos también puede ser un factor de riesgo para la ICD, como se describe en el siguiente apartado.

3.2 C. difficile en Animales

C. difficile en animales de compañía y destinados al consumo humano puede ser comensal o patógeno. A pesar de que un estudio inicial no encontró ninguna asociación entre cepas de gatos, perros y humanas [184], estudios más recientes han encontrado un solapamiento entre cepas procedentes de animales bovinos, equinos, porcinos, caninos y cepas humanas [185, 186]. En todos estos estudios, las cepas eran en su mayoría específicas de cada especie, mientras que otras fueron aisladas en múltiples especies, incluyendo la humana. De especial relevancia, es que varios estudios de distintos países han encontrados cepas indistinguibles entre humanos y otros mamíferos [187-189], lo cual sugiere una fuente común, transmisión de humano a animal o transmisión zoonótica.

En concreto, las cepas del toxinotipo V/ribotipo 078/NAP 7 o NAP8 se han descrito de forma creciente como las cepas predominantes en ganado y cerdos en Estados Unidos [186] y Europa [186, 189], también como un importante patógeno en humanos [90, 187]. En Holanda, el 4-11% de los humanos con ICD corresponden al ribotipo 078 [189], desde 2005 a 2008, la incidencia de la infección causada por estas cepas se incrementó en 14 veces, convirtiéndose en el segundo ribotipo más prevalente en humanos de ese país [90].

A diferencia de la distribución geográfica de la epidemia de la cepa NAP1/027/BI, la distribución de las infecciones humanas con ribotipos

078 se concentran en las zonas rurales, donde se crían los cerdos [90]. Las cepas del ribotipo 078 aisladas de animales y humanos fueron indistinguibles por ribotipado y por análisis de MLVA (multilocus variable-number tandem repeat analysis, que es un análisis más discriminatorio [188].

En los Estados Unidos, las infecciones causados por el ribotipo 078 también se han visto incrementadas en relación a otras cepas y parece ser más común entre ICD de origen comunitario que los episodios ICD relacionados con la asistencia sanitaria [187]. Además varias cepas correspondientes al ribotipo 078 aisladas animales destinados para el consumo humano, han sido relacionadas de forma muy estrecha o incluso han sido indistinguibles por análisis electroforético de campo pulsado de las aisladas en humanos [187].

La cepa epidémica 027, causante de los brotes en Norte América y Europa por más de una década, también ha sido aislada tanto de comida como de animales de compañía. En Canadá, el ribotipo 027, es el tercer ribotipo más frecuente en terneros [190] y así aislado de lugares geográficamente dispersos. El ribotipo 027 también ha sido aislado en caballos [191] y en un perro destinado a visitas hospitalarias en Canadá, que probablemente adquirió la cepa durante una visita a un hospital que sufría un brote por la misma cepa 027[192].

Otros ribotipos que causan enfermedad en humanos como el 017 y el 066 [193], han sido también aislados en animales[190, 194].

C. difficile ha sido aislado también de mascotas, incluyendo gatos, perros y su entorno [184, 192, 195, 196]. Parece claro, que *C. difficile* es un patógeno establecido de humanos y animales, con un solapamiento en algunas cepas entre animales y humanos. Sin embargo, las implicaciones en la epidemiología y en cómo ocurre la transmisión zoonótica. Ningún estudio ha demostrado por

el momento la adquisición de la infección en humanos a partir de un contacto con un animal, sin embargo al contrario, la adquisición por parte de animales de cepas de procedencia humana sí han sido descritas en varias publicaciones [192, 197]. Incluso si la transmisión de animales a humanos ocurre de raramente, ese contacto puede ser una fuente importante de nuevas cepas de *C. difficile* para humanos, incluyendo cepas altamente resistentes a antibióticos. La resistencia a antibióticos, incluyendo la resistencia a fluoroquinolonas, es una característica común de las nuevas cepas emergentes en humanos [198]. Se requieren más estudios para determinar el papel que tiene el contacto animal en la transmisión de *C. difficile* a humanos y *vice versa*, así como si la transmisión de animal a humano ocurre, para documentar los riesgos atribuibles a este modo de transmisión.

3.3 C. difficile en Productos de Alimentación

El primer estudio en demostrar el aislamiento de *C. difficile* de productos cárnicos, se llevó a cabo durante 10 meses durante 2005 en dos provincias canadienses. En este estudio, se aisló *C. difficile* en el 20% de los productos cárnicos muestreados, incluyendo un 21% de las muestras de carne vacuna picada y un 14% de las de carne de ternera picada [199].

En un estudio de seguimiento, utilizando una estrategia nacional de muestreo aleatorio [200], la prevalencia de *C. difficile* en los productos cárnicos fue del 6,1% (6,7% de carne picada de buey y 4,6% en chuletas de ternera). La prevalencia varió según la estación, con la prevalencia más alta (11,5%) de Enero a Febrero. Prácticamente todos los aislados recuperados eran toxigénicos, estando la mayoría de las cepas en relación con la infección en humanos, incluyendo varias correspondientes al ribotipo 027 [199] [200]. También se identificaron cepas en las que se conoce que producen ICD en

humanos como el ribotipo 077, aislado de ganado, perros y humanos [190], y el ribotipo 014, aislado de ganado y humanos [190, 201]. Una cepa no toxigénica frecuentemente aislada en perros, fue recuperada de productos cárnicos en ambos estudios [185, 199, 200].

En un estudio de productos cárnicos más variado llevado a cabo en Estados Unidos, encontró *C. difficile* en el 42% de la carne de vacuno, cerdo y pavo procedentes de tiendas de alimentación en Arizona durante tres meses[202]. A pesar de que todos los productos fueron adquiridos en la misma ciudad, los productos fueron, con una excepción, marcas de distribución nacional. Se encontró *C. difficile* tanto en productos crudos como en aquellos listos para el consumo y en todos los tipos de carnes muestreados. La proporción de muestras positivas varió poco según el tipo de carne (50%-4,6%). La mayoría de los aislados recuperados correspondieron al ribotipo 078 (73%) y fueron similares a aquellas obtenidas de animales destinados para el consumo y humanos. Los aislados restantes fueron ribotipo 027 o relacionados con el NAP1.

En otro estudio, se aisló *C. difficile* en 3 (7,5%) de las 40 ensaladas listas para consumir en Escocia [203]. Estas ensaladas habían sido importadas de otros países de la Unión Europea. Todos los aislados fueron toxigénicos, 2 del ribotipo 017, una cepa común de ICD en Europa [204], y un ribotipo 001, común entre aislados clínicos del Reino Unido y previamente la cepa epidémica en Estados Unidos [25].

C. difficile también ha sido aislado en carne europea, pero la tasa de contaminación es menor que la comunicada por Estados Unidos y Canadá [205-207].

La variación en los métodos de cultivo utilizados puede haber contribuido a la diferencia de la prevalencia encontrada en los distintos estudios.

Actualmente no existe un protocolo oficial para la detección de *C. difficile* en comida. A pesar de que los estudios incluían distintos métodos de cultivo, todos realizaron un paso previo en medios de enriquecimiento, lo cual hace difícil el evaluar de manera cuantitativa la cantidad de esporas presentes en las carnes estudiadas. Sin embargo, un estudio canadiense concluyó que era mejor incluir el paso previo en medio de enriquecimiento, sugiriendo que la cantidad de esporas presentes es baja [208]. En este estudio, la siembra directa solo recuperó el 30% de los aislados de *C. difficile*. De entre las que crecieron en siembra directa, la media de la cantidad de esporas fue de 30/gramo (rango 20-60 esporas/gramo) para carne porcina y de 100/gramo (rango 20-240) para vacuno [208]. La dosis infectiva de esporas para humanos es actualmente desconocida.

Estos hallazgos sugieren que la presencia de *C. difficile* es relativamente común en productos cárnicos de múltiples países, aunque a bajas concentraciones de esporas. Todavía quedan muchas preguntas sin responder a cerca del mecanismo por el cual se introduce *C. difficile* en la comida.

A pesar de que la fuente de *C. difficile* en la comida no se conoce, parece posible que la presencia de *C. difficile* en carne contaminada se origine en las pieles de los animales, siendo la fuente original el contenido intestinal. La contaminación interna de la carne también es posible, ya que las esporas de *C. difficile* se han encontrado en el músculo esquelético de caballos [209]. Por tanto, la contaminación puede ser inherente en las carnes y puede no ser prevenible con un procesamiento cuidadoso o descontaminación de superficies.

Otra posible fuente de *C. difficile* en la comida, es la contaminación durante la manipulación, aunque no hay evidencia que apoye esta posibilidad. A diferencia de otros contaminantes bacterianos de la carne, el cocinado puede no acabar con *C. difficile*; las esporas pueden sobrevivir en carne picada de vacuno a pesar de una correcta manipulación y de unas adecuadas temperaturas de cocción [199].

4. Clínica

4.1 Portadores Asintomáticos de *C. difficile*

La colonización por *C. difficile* es la presencia del microorganismo en una persona sin síntomas clínicos. Aproximadamente un 3-5% de los adultos y un 50% de los neonatos con *C. difficile* están colonizados. Parece que los pacientes colonizados y con una respuesta IgG adecuada a la enterotoxina habitualmente permanecen asintomáticos[16]. En los pacientes hospitalizados esta tasa de colonización se incrementa hasta un 25-30%[210]. Recientemente se ha demostrado, el importante papel que juegan en la transmisión de la ICD, los pacientes colonizados, comparados con aquellos no colonizados, las esporas de los portadores asintomáticos se observó que eran fácilmente transferibles a las manos de los investigadores [211]. Estos datos sugieren que la ICD, se transmite desde el entorno o las manos de los trabajadores sanitarios a otros pacientes. Es frecuente que los animales de ganado porten *C. difficile* en el tracto gastrointestinal, actuando como posibles reservorios para la transmisión de cepas relevantes, causando infección en humanos [185, 212].

4.2 Presentación Clínica

C. difficile puede causar una amplia variedad de cuadros clínicos que pueden ir desde una diarrea leve hasta una enfermedad grave y fulminante [213].

Los síntomas pueden comenzar desde poco tiempo tras la colonización, con una mediana de 2-3 días hasta semanas más tarde [214, 215].

Los síntomas sistémicos están típicamente ausentes en las formas leves y moderadas, en la exploración física en ocasiones se encuentra únicamente un leve dolor a la palpación y distensión abdominal. Una de las manifestaciones más frecuentes es la diarrea, en las formas leves o moderadas, La diarrea es generalmente el único síntoma con un número de deposiciones considerablemente menor a 10 deposiciones al día [216].

La diarrea acuosa leve a moderada puede ir acompañada de moco o sangre oculta en heces, pero la presencia de melenas o hematoquecia es rara. Puede cursar con fiebre, calambres, dolor abdominal y leucocitosis, aunque esto sucede sólo en aproximadamente la mitad de los pacientes [73, 153, 217, 218]. La diarrea se resuelve típicamente con la suspensión de los antibióticos [219].

La colitis sin formación de pseudomembranas es una forma más grave de ICD caracterizada por la presencia de fiebre, malestar general, diarrea acuosa de elevado volumen, en el cual las heces de los pacientes pueden tener alguna traza de sangre, náuseas, anorexia, dolor abdominal y la leucocitosis es frecuente.

En la sigmoidoscopia, la colitis eritematosa es parcheada sin formación de pseudomembranas (Figura 9)[219].



Fig. 9 Colitis con cambios mínimos (mucosa eritematosa)

La colitis pseudomembranosa es una enfermedad sistémica; en la que los pacientes presentan dolor y distensión abdominal, la diarrea es grave y puede llegar a ser sanguinolenta. Los recuentos de leucocitos pueden ser de 20.000 células/ μ l o mayores, y la hipoalbuminemia de 3,0 o menor en los pacientes graves [220]. La hipoalbuminemia es el resultado de una importante pérdida de proteínas.

La sigmoidoscopia muestra en estos casos la presencia de las clásicas pseudomembranas, que son placas amarillentas y elevadas de unos 2-10mm de diámetro, que se encuentran distribuidas sobre la mucosa colorectal [221]. Estas placas son pequeñas ulceraciones de la membrana mucosa, que desencadenan la liberación de proteínas séricas, moco y células inflamatorias (Figura 10).



Fig. 10 Colitis Pseudomembranosa

En la mayoría de los pacientes se ve afectado el área rectosigmoidea. En una minoría de pacientes, se puede ver afectado el colon derecho, presentando una marcada leucocitosis y dolor abdominal, pero poca o ninguna diarrea. La ICD que afecta al intestino delgado (enteritis) tras colectomía total también se ha descrito [222]. La inflamación colónica también puede observarse en la tomografía computarizada (TAC) como un incremento del grosor de la pared del colon (Figura 11)[223].

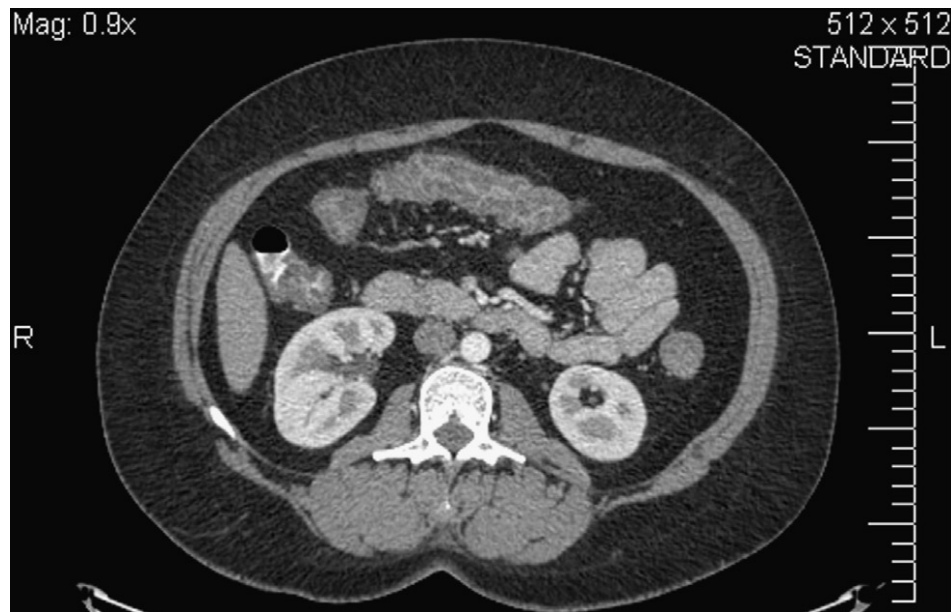


Fig 11. Engrosamiento del colon en un paciente con ICD, imagen con contraste.

4.2.1. Colitis fulminante (íleo paralítico, megacolon tóxico, perforación colónica)

La ICD se puede presentar de forma fulminante en aproximadamente un 3% de los pacientes, siendo causante de la mayoría de las complicaciones graves, que incluyen perforación colónica (Figura 12), íleo prolongado, megacolon tóxico y muerte [63]. Es un síndrome inflamatorio sistémico que puede incluir intenso dolor abdominal difuso o de los cuadrantes inferiores, con o sin diarrea, fiebre elevada, escalofríos, hipotensión, taquipnea y marcada leucocitosis [224, 225]. Se debe tener en cuenta que la diarrea puede no estar presente en pacientes con una ICD severa cuando produce íleo paralítico. Los pacientes con megacolon tóxico presentan un colon dilatado con síntomas de toxicidad grave como fiebre, escalofríos, deshidratación y marcada leucocitosis (Figura 13) [63].

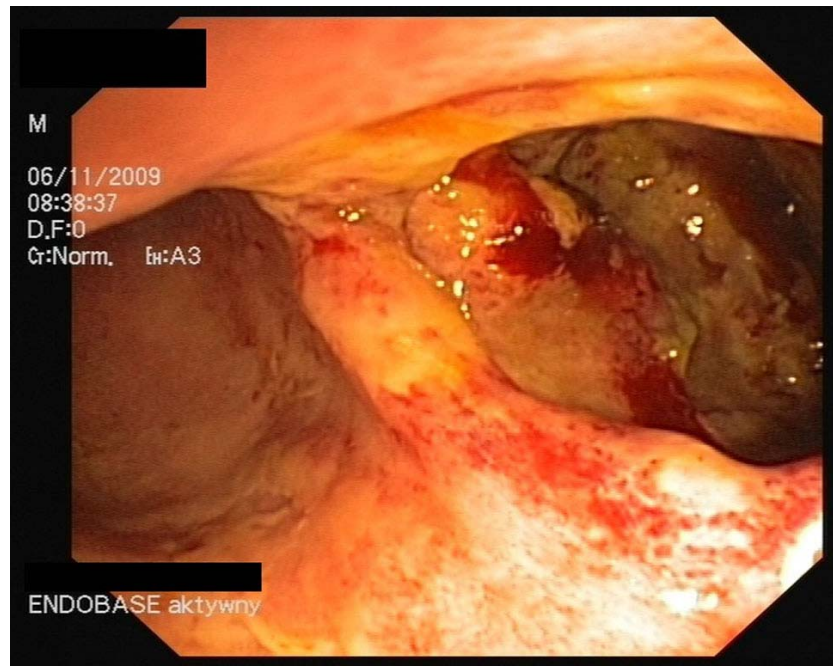


Fig. 12. Perforación colónica



Fig 13. Megacolon tóxico

4.2.2. Infecciones Extraintestinales

Las infecciones extraintestinales por *C. difficile* son raras y se presentan tan sólo en 4 casos por cada 100.000 hospitalizados [226]. García-Lechuz *et al.*, publicó una serie de 17 casos de infecciones extra intestinales por *C.difficile* ocurridos en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón durante un periodo de diez años. De ellos, una mayoría fueron infecciones relacionadas

anatómicamente con el colon: 5 casos de peritonitis, 4 infecciones de la herida quirúrgica abdominal y 3 abscesos intra-abdominales. Sólo cinco casos se presentaron en localizaciones lejanas al colon: 1) un absceso cerebral secundario a una otitis media supurada polimicrobiana, en donde además de *C.difficile* se aislaron otros dos microorganismos, 2) una bacteriemia secundaria a colitis isquémica, 3) una pielonefritis bacteriémica, 4) una osteomielitis crónica del pie y 5) una úlcera infectada en un pie isquémico. En la mayoría de los casos se aislaron otras bacterias, además de *C.difficile* en las muestras clínicas [226].

Se han descrito también en la literatura al menos 40 casos raros de artritis reactiva por *C. difficile*, con una presentación mono o poliarticular, que aparece casi simultánea a la diarrea [227]. Otros autores han publicado una revisión extensa de la literatura, en la que describen un amplio número de manifestaciones extraintestinales: bacteremia, peritonitis, apendicitis, abscesos intra-abdominales, abscesos cerebrales, pielonefritis, artritis reactiva, celulitis, fascitis necrosante, abscesos viscerales, empiema, osteomielitis, infecciones de prótesis articular, osteomielitis crónica. Al igual que García-Lechuz *et al.*, estos autores concluyen que en la mayoría de los casos estas infecciones son polimicrobianas, es decir no se aísla exclusivamente *C.difficile* en los cultivos de las muestras clínicas. La mayoría de estos casos estuvieron relacionados con enfermedad colónica con o sin perforación intestinal [228].

5. Factores de Riesgo

5.1 Edad

La edad avanzada, típicamente definida como aquellos pacientes mayores de 65 años, se correlaciona con un incremento del riesgo para desarrollar ICD[162, 220, 229-231]. También se ha relacionado con un riesgo incrementado de una evolución adversa de la ICD, así como de la incidencia de infección recurrente [64, 65, 232]. Zilberberg y cols.[65], observaron que los pacientes de edad avanzada tenían un 68% más de riesgo de mortalidad a los 30 días que el grupo de menor edad.

La causa de la mayor incidencia de ICD en la población anciana no se conoce, aunque existen varias hipótesis. Una posible explicación sería la existencia de una menor resistencia a la colonización por la microbiota intestinal. La microbiota intestinal de las personas de mayor edad contiene un menor número de bacterias anaerobias y bífidobacterias, y un mayor número de enterobacterias que las personas más jóvenes [233].

También podría influir la gravedad de la enfermedad de base de la mayoría de estos pacientes, la mayor frecuencia de administración de antibióticos, las prolongadas estancias hospitalarias y la debilidad de su sistema inmunitario [231], [117].

Se ha visto que los granulocitos van reduciendo su habilidad para fagocitar con la edad, y que sin embargo, su actividad bactericida no varía. Por ello, se piensa que la baja fagocitosis se equilibra con un aumento de la respuesta quimiotáctica en las personas de edad avanzada, lo que provoca una mayor respuesta inflamatoria [234].

5.2 Hospitalización

La hospitalización no es únicamente un reservorio sino un vector de transmisión. Los portadores y pacientes con ICD son una fuente para la transmisión en entornos en los que el control de la infección es difícil [235]. *C. difficile* ha sido aislado de fómites y del 30% de las superficies hospitalarias [236, 237], con el consiguiente riesgo de los pacientes de adquirir la ICD a través de la ingesta de las esporas que pueden ser transportadas de paciente a paciente por medio del personal sanitario o directamente de fómites y superficies. A medida que la tasa de colonización se incrementa de un 2-5% hasta un 30-50% en pacientes con un ingreso prolongado [154, 215, 235, 238-241], también lo hace el riesgo de desarrollar ICD [229, 242].

La duración de la hospitalización es un factor de riesgo de ICD; el aumento diario en el riesgo de contraer el *C. difficile* durante la hospitalización sugiere que la duración de la hospitalización es un indicador del grado de exposición al microorganismo de otros pacientes con ICD [243].

5.3 Antibióticos

El factor de riesgo modificable más importante para el desarrollo de la ICD es el consumo de antibióticos. La terapia antibiótica incrementa el riesgo de ICD ya que suprime la microbiota normal intestinal, proporcionando de esta manera un nicho al desarrollo de *C. difficile*.

Está bien establecido en la literatura médica que el consumo de antibióticos en los 3-4 meses previos predispone a la ICD [53, 73, 229, 242, 244, 245]. Bignardi y cols. realizaron una revisión sistemática de la literatura y encontraron que prácticamente todos los antibióticos, incluyendo el metronidazol se asocian a un mayor riesgo de ICD [242]. A pesar de que a lo largo de los años, prácticamente todos los antibióticos se han relacionado con

la ICD, actualmente las fluoroquinolonas y las cefalosporinas son los antibióticos más comúnmente asociados a la ICD [53, 246, 247]. El riesgo relativo de una terapia con un determinado antibiótico va a depender en la prevalencia local de las cepas resistentes al mismo [248].

Tanto la exposición prolongada como la breve exposición a diversos antibióticos [249], en contraposición a la exposición a un único antimicrobiano aumenta el riesgo de ICD. No obstante, incluso una exposición muy limitada, como la de los antibióticos de una sola dosis que se administran como profilaxis antes de una cirugía aumentan el riesgo tanto de colonización como de infección sintomática [250, 251].

Además, el uso concomitante y mantenimiento de los antibióticos durante el tratamiento de la ICD aumenta el riesgo de recurrencia de la ICD [44, 57, 252, 253].

5.4 Otros Factores de Riesgo

La quimioterapia es otro factor de riesgo, que en parte se debe a la actividad antimicrobiana de algunos agentes [252, 254], pero también a los efectos inmunosupresores de los mismos [44, 46].

Recientemente, se ha visto que en estados Unidos la causa más frecuente de diarrea en pacientes VIH, es *C. difficile*, lo cual sugiere que estos pacientes tienen un riesgo mayor de ICD debido a su inmunosupresión de base, la exposición a antimicrobianos y al sistema sanitario[255].

Otros factores de riesgo incluyen la cirugía gastrointestinal [256] o la manipulación del tracto digestivo, incluyendo la sonda nasogástrica [257]. Otros potenciales factores de riesgo, algo controvertidos son las medicaciones supresoras de ácido estomacal, como los antihistamínicos anti-H2 y los inhibidores de la bomba de protones (IBP). A pesar de que numerosos estudios

recientes sugieren una relación epidemiológica entre los supresores de ácido y la ICD, sobre todo los IBP [162, 230, 258-260], existen también otros estudios bien controlados que sugieren que esta asociación es debida a un factor de confusión con la gravedad de enfermedad de base subyacente y la estancia hospitalaria prolongada [65, 261, 262].

6. Recurrencia de la Infección

Existen en la actualidad numerosas definiciones para la recurrencia de la ICD, la definición que han adoptado las nuevas guías europeas [263], es la siguiente: la ICD que vuelve a ocurrir dentro de las 8 semanas tras el comienzo de los síntomas de un episodio previo, siempre y cuando los síntomas del episodio previo hubieran sido resueltos tras completar la terapia antibiótica inicial.

La recurrencia de los síntomas después del tratamiento inicial adecuado de un episodio de ICD ocurre entre en un 6 y un 40% de los casos y puede deberse tanto a la recaída de la infección inicial como a la reinfección con una cepa nueva [1, 12]. No es factible en la práctica clínica distinguir entre recurrencia debida a una recidiva o una reinfección.

La recurrencia puede aparecer días o semanas después de finalizado el tratamiento, y la clínica puede ser similar o más grave que la del episodio inicial (14). Se ha demostrado que la R-ICD induce una mayor morbi-mortalidad de la infección y un incremento de la estancia hospitalaria con el consiguiente aumento del coste hospitalario.

Uno de los factores que parece contribuir a la R-ICD es la resistencia disminuida a la colonización, que permite la proliferación de *C difficile* y la

producción de sus toxinas. Otro factor puede ser la respuesta inmune del huésped, en una pequeña serie de casos los pacientes que desarrollaban R-ICD presentaron niveles más bajos de IgA e IgG frente a la toxina B que aquellos que no recurrieron [16].

Los factores de riesgo más frecuentes que se han descrito para el desarrollo de R-ICD son el uso continuo de antibióticos predisponentes de ICD, edad avanzada, hipoalbuminemia, diabetes mellitus y uso de antiácidos [46]. Una recurrencia hace más probable la aparición de nuevas R-ICD.

Las tasas de R-ICD no parecen estar en relación con el antibiótico tratante. En la primera serie más amplia de pacientes con R-ICD publicada en 1980, documentó R-ICD en 11 de los 79 pacientes (14%) con CPM tratada con vancomicina. Desde 1980, otros antibióticos han sido estudiados y las tasas de R-ICD han sido documentadas, siendo el metronidazol el antibiótico más ampliamente estudiado aunque también se han descrito series más pequeñas con teicoplanina, ácido fusídico y bacitracina [10] (Tabla 1).

Tabla 1. Recurrencia de la infección por *C. difficile* según tratamiento antibiótico

Antibiótico	Nº Estudios	Rango R-ICD Publicado	R-ICD/pacientes estudiados	Total R-ICD
Vancomicina	8	7-42%	41/265	20%
Metronidazol	4	14-31%	22/155	19%
Teicoplanina	3	0-7,7	4/69	4,9%
Ácido Fusídico	2	25-28%	13/49	26,5%
Bacitracina	1	41,6%	5/12	41,6%

En un reciente ensayo, se comparó la tasa de R-ICD en pacientes tratados con vancomicina y metronidazol, se comunicaron unos valores de R-

ICD del 7% en pacientes tratados con vancomicina y de un 14% para los pacientes tratados con metronidazol y no se observó un incremento en la gravedad en los mismos [264].

Otro factor de riesgo parece ser la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). En dos series se documenta un sustancial incremento de la R-ICD en pacientes con EII [265, 266], con tasas que se duplican en los pacientes con enfermedad de Crohn y se triplican en la colitis ulcerosa [265]. La enfermedad se presentaba de forma más grave, siendo la inmunosupresión uno de los factores de riesgo significativos [266].

Es importante considerar que la R-ICD está asociada a un aumento de la estancia hospitalaria y a una mayor morbi-mortalidad que conlleva una elevación importante de los costes sanitarios[62].

El tratamiento de la R-ICD, será abordado en el apartado 8 (Tratamiento).

7. Diagnóstico

7.1 Diagnóstico de Laboratorio (Microbiológico)

7.1.1 Tipo de Muestra

Las guía internacionales están de acuerdo en que el diagnóstico microbiológico de ICD solo debe realizarse en muestras de heces no formes de pacientes con diarrea (>3 deposiciones no formadas en 24 horas) [1, 267]. En los casos en los que el paciente sufre de íleo, megacolon tóxico o distensión

abdominal sin diarrea, generalmente no es posible obtener muestras de heces no formes para el diagnóstico de ICD. En esta situación, los procedimientos diagnósticos recomendados por las distintas guías internacionales son variados. Las guías americanas (SHEA e IDSA), recomiendan la obtención de muestra a través de torundas rectales cuando el envío de muestras de heces no es posible [1, 267]. De forma contraria las guías de la sociedad americana de microbiología (ASM, no recomiendan las muestras rectales y su recomendación es la de realizar los procedimientos diagnósticos sobre muestras de heces formes, cuando sea posible su obtención, y tras consenso con el clínico (<http://www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile9-21.pdf>).

Un estudio realizado por McFarland y cols. [268], parece clarificar esta cuestión, los autores comparan la rentabilidad diagnóstica de torundas rectales y de las muestras de heces de pacientes hospitalizados con ICD. En este estudio se muestra que las muestras de torunda rectales son tan sensibles como las muestras de heces para el diagnóstico de ICD.

El valor de determinar la presencia de *C. difficile* toxigénico en biopsias de la mucosa colónica en pacientes con colitis es otra cuestión debatida [269]. A pesar de que el cultivo de las biopsias de colon obtenidas por colonoscopia han sido aceptadas tradicionalmente para el diagnóstico de ICD, los cultivos de muestras de heces, las cuales son una opción más barata y menos invasiva, podrían ser una mejor opción para el diagnóstico de ICD. En un estudio retrospectivo, realizado en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid, el rendimiento diagnóstico tanto de las biopsias de colon y muestras de heces de pacientes en las que se habían obtenido estos dos tipos de muestra durante el periodo 1997 a 2011. De las 500 muestras pareadas, 75 pacientes (15,0%)

fueron diagnosticados al menos por una de estas muestras. La sensibilidad de las muestras de heces (94,7%), fue significativamente más alta que la de las biopsias de colon (21,3%) ($p < 0.001$). Los resultados de este estudio muestran claramente que las muestras de heces para el diagnóstico de la ICD es la muestra más recomendable [Alcalá L. y cols. datos no publicados].

No se recomienda testar las muestras de pacientes asintomáticos, por el riesgo de falsos positivos debido a los portadores. La realización de pruebas en pacientes menores de dos años, ya que son comúnmente portadores asintomáticos, es de cuestionada utilidad [270].

7.1.2 Número de muestras para el diagnóstico de la ICD

La necesidad de realizar pruebas en sucesivas muestras para incrementar el rendimiento diagnóstico está bajo discusión. En un intento por clarificar esta cuestión, Aichinger y cols. [271] compararon el impacto de repetir las pruebas para el diagnóstico de la ICD. Analizaron los datos de los pacientes que tenían dos o más muestras en un periodo de 7 días, de los 1.321 pacientes que habían tenido una muestra inicial negativa por enzimoimmunoanálisis (EIA), 25 (1,9%) fueron positivos en una segunda muestra (95% CI, 1.2% a 2.7%), comparado con un 1,7% (95% CI, 0.7% a 3.5%) que fueron positivas de 401 pacientes que tuvieron una PCR inicial negativa ($p = 1.000$). Los autores concluyeron que la rentabilidad diagnóstica de la repetición de muestras para el diagnóstico de la ICD es igualmente baja tanto por PCR y como por EIA, y por tanto no debería realizarse de manera rutinaria.

En un estudio similar, Van der Berg y cols. [272] encontraron que de 78 pacientes, solo uno de ellos fue positiva tras repetirla por EIA dentro de un

periodo de 7 días. Los autores de este estudio concluyeron que si la prueba inicial es negativa, la repetición con otra muestra es innecesaria.

En otro estudio [273], todas las muestras realizadas por EIA (Wampole *C. difficile* Tox A/B II enzyme immunoassay kit) realizadas durante 2006, se analizaron de manera retrospectiva. De un total de 8.256 pruebas de 3.112 pacientes; el 49% se repitieron. De las 3.749 muestras negativas inicialmente, 96 (2,5%) fueron positivas tras repetir la muestra dentro de los 10 días siguientes. El 38% tuvieron una muestra positiva dentro de las 48 horas siguientes, 18 pacientes fueron tratados de manera empíricamente mientras que 16 de ellos fueron tras tratados tras el nuevo resultado. Ninguno evidenció complicaciones médicas. De las inicialmente positivas, el 91% de los pacientes fueron positivos tras repetición de la muestra en el mismo día, el 75% en el día +1, el 58% en el día +2, hasta un porcentaje bajo del 14% en los días +7-10. Dependiendo del contexto clínico, estos datos apoyarían el no repetir las pruebas en las 48 horas siguientes a una prueba inicial negativa.

Las guías de la IDSA y SHEA [1], recomiendan solo una única muestra para el diagnóstico de la ICD. La ASM no recomienda repetir la prueba tras un resultado negativo obtenido tras un algoritmo diagnóstico de alta sensibilidad. Según la ASM, el resultado de realizar la prueba en una segunda muestra de un paciente con un resultado negativo inicial es más probable que sea un falso positivo. Las guías europeas [267], no recomiendan repetir el diagnóstico en otra muestra obtenida durante el episodio en una situación endémica (nivel 2 de evidencia científica) , aunque puede ser de utilidad en una situación epidémica (nivel 3 de evidencia científica).

7.1.3 Pruebas diagnósticas de curación de la ICD

Realizar pruebas diagnósticas de curación o respuesta en muestras de heces no se recomienda. La respuesta terapéutica generalmente incluye la resolución de la fiebre en el primer día y de la diarrea antes del cuarto o quinto día desde el comienzo del tratamiento [274]. A pesar de que haya resolución clínica del episodio, las esporas de *C. difficile* pueden sobrevivir en el lumen de pacientes curados durante semanas o meses [275, 276].

En un estudio realizado pacientes curados tras un episodio previo recurrente, McFarland y cols.[277], encontraron que la persistencia de esporas de *C. difficile* al final de la terapia antibiótica era del 56% y del 43% para aquellos pacientes tratados con metronidazol y vancomicina, respectivamente. De manera similar, en un estudio observacional de pacientes que habían recibido tratamiento para la ICD, mostró que casi el 20% de los pacientes tratados de manera exitosa tenían esporas detectables en las heces en el momento de la resolución de la diarrea y que este porcentaje se incrementaba al 56% tras 1 a 4 semanas más tarde [278]. La falta de correlación entre resolución del episodio de ICD y el aclaramiento de *C. difficile* que mostraron estos estudios, llevaron a las principales guías internacionales a no recomendar el uso del cultivo o detección de toxinas como pruebas de seguimiento de la evolución de la ICD (nivel de evidencia B-III de la SHEA-IDSA) [1, 267].

7.2 Métodos Diagnósticos de Laboratorio

El diagnóstico clínico de *Clostridium difficile* se apoya en el diagnóstico de laboratorio. Los métodos de diagnóstico de laboratorio que se han utilizado

tradicionalmente (ensayo de citotoxicidad y cultivo toxigénico) tienen prolongados tiempos de respuesta, lo cual ha limitado su utilidad para la práctica diaria. Como resultado de esto, cuando surgieron los EIAs para el diagnóstico de la ICD, fueron ampliamente adoptados por los laboratorios por su rapidez. Sin embargo, se ha demostrado que estos métodos no tenían una sensibilidad adecuada, lo cual ha resultado en una era de técnicas de detección molecular basados en amplificación de ácidos nucleicos. A continuación, se detalla cada uno de los métodos diagnósticos de laboratorio para el diagnóstico de la ICD.

7.2.1 Ensayo de Citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad se realiza preparando un filtrado de las heces, que luego es trasladado a una monocapa de una línea celular apropiada. Se han utilizado un amplio número de líneas celulares para este fin, como fibroblastos de prepucio humano, fibroblastos diploides humanos, células Vero, células McCoy, fibroblastos pulmonares MRC-5 y células Hep2. Tras una incubación de 24 a 48 horas, se observan las células para ver el efecto citopático; si se observa este efecto, se realiza un ensayo de neutralización con para asegurar que el efecto sea debido a las toxinas de *C. difficile* y no a una toxicidad inespecífica [279]. El ensayo de neutralización se realiza con antisuero de *C. sordellii* o *C. difficile* (Figura 14). A pesar de que la toxina B es la que se detecta mayoritariamente en este ensayo, la toxina A también se detecta hasta cierto punto [74].

El ensayo de citotoxicidad se ha considerado tradicionalmente como el método de referencia [280]; sin embargo actualmente este método se considera por la mayoría de expertos que no tiene la suficiente sensibilidad como para ser el método de referencia. Las sensibilidades descritas para este método son

variables oscilando entre el 65%-90%[1, 279]. Cando se compara con el cultivo toxigénico la sensibilidad es de un 65%-80% [281-283].

El rendimiento del ensayo de citotoxicidad varía en función de numerosos factores, las toxinas pueden degradarse en la muestra, por lo que si hay un retraso en el transporte al laboratorio, puede dar lugar a un resultado falsamente negativo. Además, también pueden variar en función de la línea celular utilizada, el tiempo entre los síntomas y la recolección de la muestra, el pretratamiento del paciente con terapia antibiótica frente a *C. difficile*; factores analíticos, como la preparación del filtrado fecal también puede influir en el la sensibilidad de este ensayo [74, 284-286].

El ensayo de citotoxicidad ha caído fuera del diagnóstico de rutina de la ICD, como resultado de su baja sensibilidad, el relativo tiempo prolongado de respuesta (24-48 horas), y el requerimiento de personal experto en el mantenimiento de líneas celulares e interpretación de los resultados.

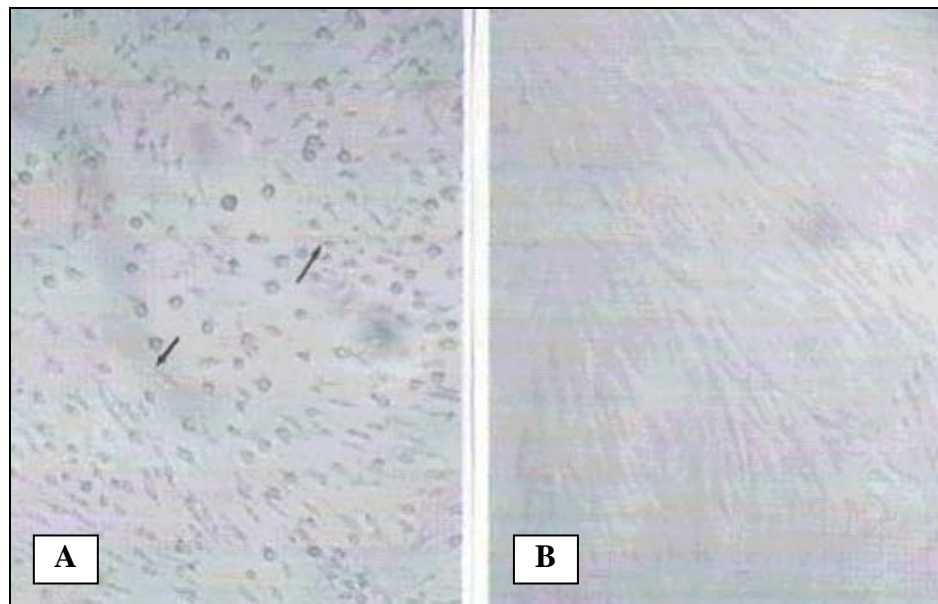


Fig. 14. Efecto citotóxico de la cepa de referencia 10463 en ausencia (A) o presencia (B) de antitoxina de *C. difficile*.

7.2.2 Cultivo Toxigénico

El cultivo toxigénico de *C. difficile* se basa en el aislamiento de este microorganismo de muestras de heces y la determinación de la capacidad de producir toxina de la cepa aislada. Existen multitud de distintas técnicas la realización de esta técnica, la esencia de todas las técnicas empleadas es el uso de un agar o caldo con distintos agentes selectivos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos que se encuentran en la microbiota fecal y que incrementan la recuperación de *C. difficile*. Hasta la fecha no existe un consenso sobre cuál es el mejor método para recuperar este microorganismo. Algunos investigadores han empleado un choque con calor o etanol para aumentar la recuperación de esporas de *C. difficile* en detrimento de los otros microorganismos [287-289]. Una gran variedad de formulaciones de distintos medios se han descrito, la gran mayoría se basan en la habilidad de *C. difficile* para fermentar la fructosa[290]. Uno de los medios más comúnmente empleados es el CCFA, compuesto de cicloserina, cefoxitina y agar fructosa[291]. Se han descrito una variedad de modificaciones sobre este medio, una de las más conocidas es el medio de Brazier que incorpora yema de huevo[292]. También se han incluido distintos agentes que potencian la germinación de las esporas como el taurocolato o la lisozima [293, 294]. Independientemente del medio utilizado, los cultivos se incuban durante 24-48 horas en atmósfera anaerobia.

Una vez que se aíslan colonias sospechosas de ser *C. difficile*, estas se pueden identificar fácilmente por la tinción de gram, la morfología de la colonia y el olor típico a caballeriza (Figura 15). También existen diversos métodos comerciales para su identificación, de forma más reciente también puede ser identificado por espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo

(MALDI-TOF). Una vez que la colonia ha sido identificada, se debe realizar una prueba de su capacidad para producir toxina. Frecuentemente, se realiza suspendiendo unas colonias en un caldo de enriquecimiento (como el medio prereducido cerebro-corazón) y realizando a partir del mismo un ensayo de citotoxicidad. De manera alternativa se pueden realizar EIAs sobre las colonias, este es un sistema bastante rápido[295].



Fig.15 Morfología de las colonias de *C. difficile*

Además de los métodos tradicionales de cultivo, se han desarrollado medios cromogénicos para la detección de *C. difficile*; estos medios pueden impulsar la recuperación de *C. difficile* de las muestras fecales. Por ejemplo, se puede realizar una identificación presuntiva de *C. difficile* basada en el color negro de las colonias en el medio de bioMérieux chromID. Un estudio reciente comparó el agar bioMérieux chromID *C. difficile* con el agar taurocolato cicloserina cefoxitina y el medio bioMérieux CLO [296]. En este estudio, se cultivaron 406 muestras de pacientes hospitalizados, el método de referencia para la comparación fue la recuperación de *C. difficile* en cualquiera de los medios, el agar chromID tuvo una sensibilidad del 74% a las 24 horas y del 87% a las 48 horas.

Los medios cromogénicos usualmente son más caros que otro tipo de medios, Sin embargo, los estudios hasta la fecha demuestran que son unos medios sensibles que pueden acelerar la identificación presuntiva de *C. difficile*. El cultivo toxigénico es típicamente considerado como un método de referencia más que un método diagnóstico. Es imperativo que al menos un subgrupo de laboratorios mantengan la experiencia en el cultivo de *C. difficile* para poder realizar estudios comparativos, epidemiológicos y de sensibilidad aunque por su laboriosidad y el tiempo de respuesta de este método no se considera práctico para el diagnóstico de rutina. Además, el cultivo detecta la habilidad de producir toxina *in vitro* y puede no reflejar la producción de toxina *in vivo* en el huésped.

En resumen, el cultivo toxigénico es actualmente considerado por la mayoría como el método de referencia o estándar de oro y así lo apoya la SHEA/IDSA [1]. Sin embargo, algunos pocos argumentan que a pesar de ser más sensible que la citotoxicidad en detectar *C. difficile*, puede no ser superior para el diagnóstico de casos clínicos de ICD [280].

7.2.3 EIAs- Detección de Toxina

Los enzimoimmunoanálisis (EIA) para el diagnóstico de la ICD utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales frente a las toxinas de *C. difficile*. Los EIA comerciales que detectan bien la toxina A únicamente o bien ambas toxinas (A y B) han sido las técnicas más ampliamente utilizadas en la mayoría de laboratorios del mundo. Hasta hace unos años, la mayoría de los laboratorios utilizaban EIAs que detectaban únicamente la toxina A, sin embargo con el conocimiento de la existencia de cepas A-/B+, se desarrollaron EIAs que detectan las dos toxinas [297-300]. A pesar del extenso uso de los

EIAs, estas pruebas han demostrado tener una baja sensibilidad y especificidad en comparación con el cultivo toxigénico [295, 301-306]. Las sensibilidades de los EIAs pueden ser tan bajas de hasta un 40% y raramente superiores al 60% de sensibilidad. Además, en poblaciones de baja prevalencia de ICD, el valor predictivo positivo de estas pruebas puede ser de tan solo el 50%.

Por estos motivos la IDSA y la SHEA consideren este método como subóptimos para el diagnóstico de la ICD (recomendación BII) [1]. De manera similar la ASM, considera que estas pruebas no tienen la suficiente sensibilidad y recomienda que estas pruebas no se utilicen como única prueba diagnóstica (<http://www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile9-21.pdf>). Tras un estudio que revisó 13 EIAs comerciales que detectaban la toxina A y/o B la ESCMID recomienda el uso de otras pruebas más sensibles con un mayor valor predictivo positivo para el diagnóstico rápido de la ICD [267].

7.2.4 EIAs- Detección de Antígeno Glutamato Deshidrogenasa

La glutamato deshidrogenasa (GDH) es una enzima metabólica codificada por el gen *gluD*. Este antígeno es producido en niveles elevados por todos los aislados de *C. difficile*, incluyendo las cepas toxigénicas como las no toxigénicas. Además esta enzima presenta una reacción cruzada con la de *C. sordellii*. Las pruebas iniciales se desarrollaron como ensayos de aglutinación en látex, pero presentaban una sensibilidad de tan solo el 58-68% y una especificidad del 94-98% [307, 308]. Sin embargo al adaptarse utilizando una metodología de EIA, demostraron un incremento de la sensibilidad llegando a valores que oscilan entre el 85%-95% de sensibilidad y una especificidad del 89%–99% [309, 310] . Por sus características, alto valor predictivo negativo

resultados disponibles de forma rápida y relativo bajo coste (en comparación con las pruebas moleculares) esta prueba se recomienda por las sociedades internacionales como una prueba de cribado o screening [1].

Por lo tanto esta prueba se debe utilizar como prueba de cribado y debe ser complementada con una prueba confirmatoria como EIA de toxina o prueba molecular para la detección de toxinas.

7.2.5 Pruebas Moleculares

El uso de pruebas de detección de productos de amplificación de ácidos nucleicos en muestras de heces comenzó a aparecer en la literatura médica al comienzo de la década de los 90 [311]. Estos ensayos utilizaban métodos de PCR convencionales y su diana era una variedad de genes, que incluía *tcdA*, *tcdB*, y los genes 16S rARN. A pesar de que la sensibilidad era superior a los métodos de cultivo las extracciones eran engorrosas y consumían mucho tiempo, los productos de PCR eran detectados por electroforesis en gel y/o análisis "Southern Blot" [312, 313].

Una década más tarde, los métodos de extracción de ADN habían mejorado gracias a la aparición de kits que utilizaban una mezcla de RNAsas, proteasas y otros reactivos en combinación con las columnas para la purificación y concentración y actualmente existen sistemas de PCR a tiempo real.

No fue hasta 2009 cuando la FDA aprobó el primer sistema de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de *C. difficile* en muestras de heces, el sistema BD GeneOhm Cdiff assay (BD Diagnostics Inc., Sparks, MD.), que detecta regiones conservadas del gen *tcdB*. Otros sistemas aprobados por la FDA son los sistemas BD MAX (Becton Dickinson), Xpert® C.

difficile (Cepheid), prodesse® proGastro™ CD (Gen-Probe) y Illumigene® *C. difficile* (Meridian). La detección no solo del gen *tcdB* sino también de los genes de la toxina binaria, así como la detección del nucleótido 117 del *tcdC*, son características únicas del ensayo Xpert *C. difficile* Epi assay (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA). El ensayo Illumigene (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH) es la única prueba molecular aprobada por la FDA que se basa en el principio de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Este ensayo detecta una región conservada del *tcdA* [314].

La sensibilidad de la mayoría de estas técnicas es muy elevada con valores del 90-100% cuando se comparan con el cultivo toxigénico. Sin embargo, el coste de estas técnicas hasta el momento elevado [315].

7.2.6 Algoritmos Diagnósticos

Dadas las limitaciones de las pruebas rápidas, se han propuesto varios algoritmos de varios pasos, en los que se utiliza un EIA de GDH dada su elevada sensibilidad [316-319]. Como la mayor parte de las muestras enviadas al laboratorio son negativas, el cribado con GDH, reduce de manera sustancial el número de muestras que requieren una posterior evaluación con métodos más específicos (EIA toxinas o métodos moleculares). La rentabilidad y el tiempo de respuesta dependerán de la prueba confirmatoria utilizada. Hasta el momento las guías de la IDSA y SHEA publicadas en 2010 recomiendan un algoritmo en dos pasos (nivel de recomendación BII), que incluye un cribado inicial con EIA GDH y una confirmación de los positivos con ensayo de citotoxicidad o cultivo toxigénico [1, 267]. Sin embargo, esta recomendación implica que el tiempo de respuesta del algoritmo es de 1-3 días. De manera más reciente la ASM, ha publicado un documento en el que el algoritmo

recomendado proporciona resultados rápidos y además evita el uso generalizado de las pruebas moleculares (<http://www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile9-21.pdf>).

Una de las combinaciones propuestas incluye un EIA GDH seguido por un EIA de toxina A/B y adicionalmente pruebas moleculares cuando los resultados de las muestras son EIA GDH positivas y EIA Toxinas negativa. Este procedimiento ha sido evaluado por varios autores y tiene una sensibilidad del 85-90% y una especificidad mayor de un 99% (Figura 16) [302, 320-325].

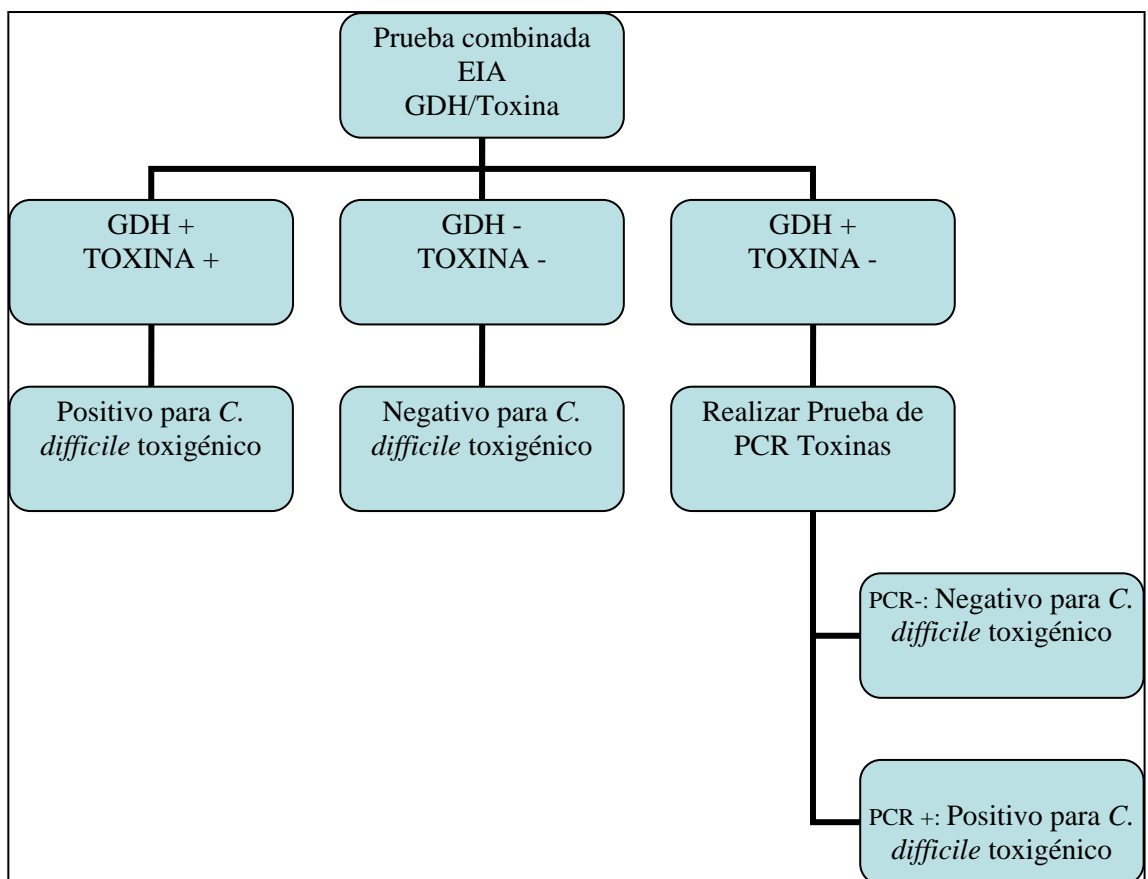


Fig. 16 Algoritmo diagnóstico

A pesar de que estos algoritmos multipasos, son procedimientos altamente coste-efectivos, con una especificidad muy elevada que asegura un alto valor predictivo positivos, incluso en situaciones de baja prevalencia de

ICD, debido a su sensibilidad, para un óptimo diagnóstico de la ICD se debe incluir un procedimiento adicional como el cultivo toxigénico.

7.2.7 Métodos de Tipado

Por numerosas razones ha habido un gran interés en la tipación de las cepas de *C. difficile* [326]. La primera de estas sería por motivos epidemiológicos a nivel global, tanto para evaluar los tipos de cepas circulantes en las distintas partes del mundo como para evaluar la evolución de las mismas. A nivel local, el tipado puede ser útil para trazar la transmisión y en situaciones de brotes.

Desde la perspectiva de diagnóstico, el rendimiento diagnóstico de algunos de los métodos pueden variar en función del tipo de cepa, lo cual puede tener una importante relevancia clínica [327]. A medida que cada más laboratorios optan por métodos diagnósticos moleculares para el diagnóstico de la ICD, más importante será monitorizar las cepas circulantes para asegurar que las cepas tengan conservadas las regiones de ácidos nucleicos que sirven como diana de estas pruebas.

Desde la perspectiva del manejo del paciente se ha postulado la importancia del tipado en algunas circunstancias, aunque el tipado de las cepas de manera rutinaria no está actualmente indicado. Algunos tipos de cepas podrían estar más relacionadas con el riesgo de R-ICD, aunque son necesarias más investigaciones para confirmarlo [328].

En un futuro, la tipación de cepas puede jugar un papel importante a la hora de establecer en pacientes con R-ICD, si se trata de una recidiva de la cepa original o de una reinfección con una nueva cepa. Es posible que con más datos, que este tipo de información puede cambiar el manejo actual de los

pacientes, estratificando las opciones terapéuticas en pacientes con R-ICD [279].

Las técnicas de tipado más habituales se describen a continuación.

- **Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)**

La PFGE fue uno de los primeros métodos de tipación molecular utilizados para *C. difficile*, y todavía se considera hoy en día como el estándar en Norte América. LA PFGE consiste en realizar primero una digestión del ADN genómico con un enzima de restricción, Smal la más utilizada [329]. Los fragmentos de ADN resultantes son separados mediante electroforesis en gel de agarosa, pero el campo eléctrico es repetidamente cambiado en tres direcciones diferentes (campo pulsado) (Figura 17). Esto permite la resolución de fragmentos grande de ADN que no podrían observarse mediante una electroforesis en gel convencional. El patrón de bandas resultantes, los tipos de cepas se denomina como “North American pulsed-field” (NAP). Las cepas con un 80% de semejanza se consideran como un único pulsotipo, aunque puede haber un importante grado de subjetividad a la hora de interpretar los resultados [330].

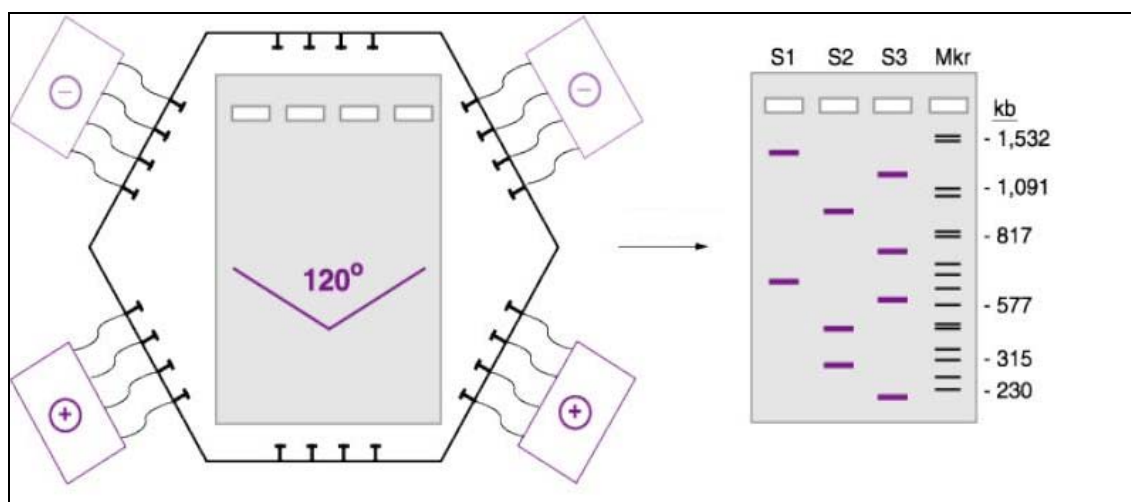


Fig. 17. Esquema de campo eléctrico de PFGE y patrón de bandas resultantes

- **Ribotipado/PCR-ribotipado**

El ribotipado es el método de tipado de cepas de *C. difficile* más utilizado en Europa. Este método se basa en la amplificación de la región del espaciador intergénico (ITS) situado entre los genes ARNr 16S y 23S. Este operon tiene varias copias en el genoma de *C. difficile*, y las distintas copias varían en cuanto a longitud. Por lo tanto, un mismo cebador o "primer" puede resultar en un patrón de bandas, generalmente en un rango de 200 a 700 pares de bases (bp) [25, 331]. Las bandas pueden ser visualizadas y comparadas a través de un gel de agarosa (Figura 18) o utilizando kits comerciales o análisis de software [25, 330-332].



Fig. 18 Visualización por UV de las bandas en gel de agarosa

Existen dos principales conjuntos de cebadores para el ribotipado: los "primers" estadounidenses y los europeos [330]. Los descritos por Stubbs y cols. parecen ser más discriminatorios que los descritos por Bidet y cols. [25, 331]. En general el tipado por PCR-ribotipado, muestra un buen poder discriminatorio, pero puede no diferenciar bien aquellas cepas relacionadas estrechamente con los ribotipos 027, 106 y 017 [333]. Puede resultar difícil

comparar los patrones de bandas entre distintos laboratorios si no se utiliza el análisis por software. Para evitar los problemas relacionados con la interpretación manual de los patrones de bandas, el ribotipado se ha adaptado de manera reciente a los capilares de electroforesis de alta resolución , lo cual ha mejorado la reproducibilidad de la interpretación del ribotipado [334]. En el Reino Unido, se está trabajando en la estandarización del protocolo de ribotipado.

El hecho de que Norte América realice PFGE y Europa realice ribotipado para la tipación de las cepas de *C. difficile* dificulta la comparación epidemiológica (Figura 19). Una limitación tanto de la PFGE como del ribotipado es la dependencia de una librería de aislados de referencia para poder comparar y dar "nombre" a las cepas, fuera de los centros de referencia y los laboratorios de salud pública, relativamente pocos laboratorios tiene acceso a esas librerías.

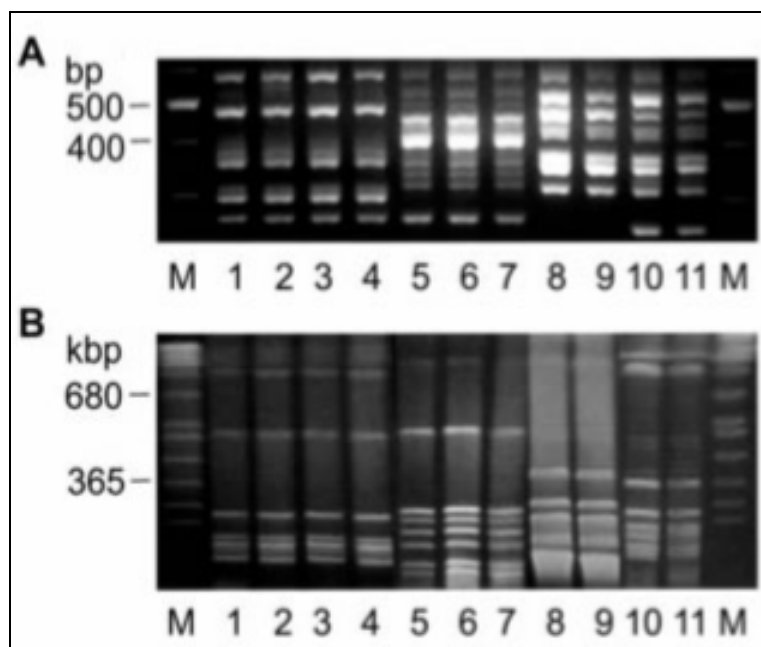


Figura 19. Patrón de bandas por PCR-Ribotipado (A) y por PFGE (B)

- **Análisis del número de repeticiones en tandem multilocus**

(Multilocus variable-number tandem-repeat analysis; MLVA).

El MLVA está surgiendo como el método de tipado utilizado para la tipación de brotes y parece ser lo suficiente discriminatorio para poder monitorizar la transmisión hospitalaria [333, 335-337]. Este método utiliza el número de múltiples repeticiones en tándem de distintos loci que están dispersos en el genoma y que varían en función del nivel de relación filogenética entre cepas (Figura 20). Los amplicones que se obtienen se discriminan utilizando electroforesis capilar, seguido de un análisis automatizado de los fragmentos. La suma de las repeticiones en tándem (STRD) se utiliza como medida de la diferencia genética entre los distintos aislados. Hasta la fecha, no se ha establecido ningún consenso en cuanto al tipado por MLVA. Distintas aproximaciones han sido descritas en la literatura, cada una de ellas evaluando 7 loci del genoma de *C. difficile* [335, 337, 338].

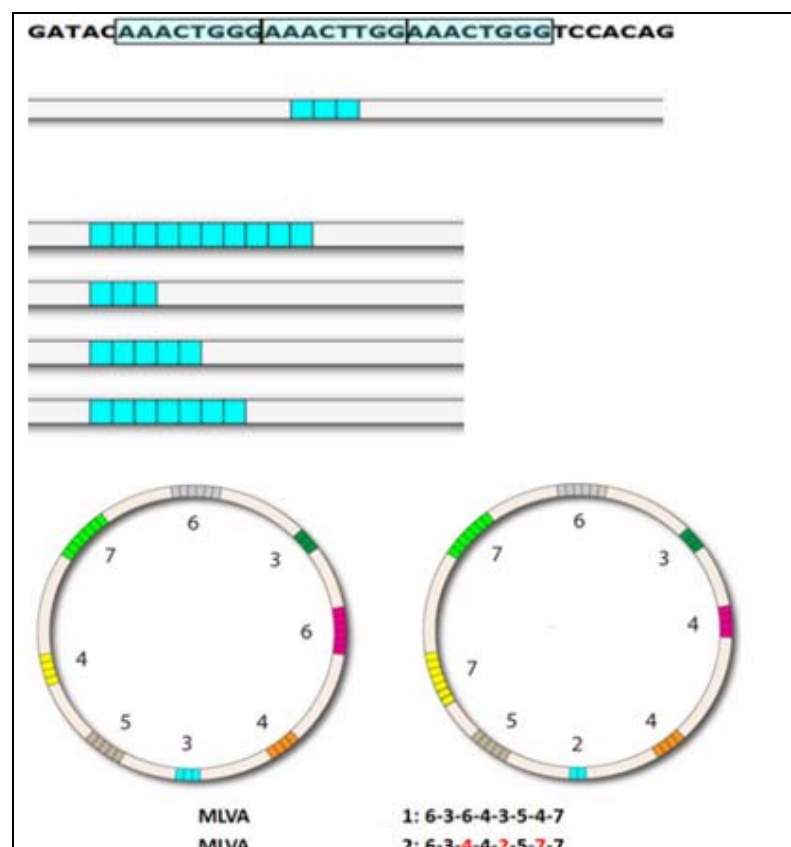


Fig. 20 El número de múltiples repeticiones en tándem de distintos loci dispersos en el genoma varía entre distintas cepas

El MLVA puede ser útil para las investigaciones de brotes y estudios locales de transmisión, pero hasta el momento, no está estandarizada, y no hay establecido un método para "nombrar" los aislados que se pueda utilizar entre laboratorios.

El MLVA es discriminativo y reproducible, por lo que si se llega a un acuerdo en cuanto al método más óptimo para su realización, los resultados podrían ser transferibles entre laboratorios y por ello comparables [279].

- **Tipado por secuenciación multilocus (Multilocus sequence typing; MLST)**

El MLST es utilizado actualmente en la mayoría de patógenos para evaluar la estructura de la población general y la diversidad entre especies. Utiliza fragmentos alélicos de un tamaño de 300-600bp, la razón histórica de ello es que los fragmentos de ese tamaño pueden ser leídos de manera fiable y reproducible en un único "run" de secuenciación mediante el método de Sanger. La mayoría de estrategias de MLST utilizan entre 6 y 12 loci, a cada secuencia única de combinación de alelos se le asigna un tipo de secuencia (ST), las bases de datos de MLST y STs son de dominio público [339, 340].

Esta plataforma permite la portabilidad del método y resultados entre distintos laboratorios [339]. *C. difficile* es un microorganismo adecuado para este tipo de análisis por su relativa heterogenicidad genética. El método de MLST aplicado a *C. difficile* fue descrito por primera vez en 2004 por Lemee y cols., los cuales usaron 7 genes (*aroE*, *ddl*, *dutA*, *tpi*, *recA*, *gmk*, and *sodA*) para analizar un grupo de aislados de *C. difficile* [341, 342].

- **Secuenciación del Genoma Completo (Whole-genome sequencing; WGS)**

La WGS tiene el potencial en convertirse en el método de tipación por excelencia, la resolución extra que provee permite evaluar transmisiones específicas dentro de un mismo "clúster" o de un mismo brote [343, 344]. De manera tradicional, la WGS ha sido considerada como una herramienta muy costosa y altamente laboriosa con un tiempo de respuesta poco apropiado para una investigación a tiempo real de un brote. Sin embargo, su precio ha comenzado a descender a la vez que ha ido mejorando su velocidad [345-347]. Una de las limitaciones que todavía tiene es que el análisis de la gran cantidad de datos que genera requiere de la bioinformática.

De manera reciente, la WGS se utilizó para estudiar la transmisión de *C. difficile* en 486 muestras de casos documentados en un periodo de 4 años en Oxfordshire, Reino Unido [348], utilizando una plataforma de Illumina. Este estudio identificó transmisión directa en un conjunto de aislados mientras que la transmisión directa para la mayoría fue descartada donde los métodos de tipación convencionales lo habrían dado como transmisión directa. En otro estudio fueron comparadas las secuencias de cepas locales con las obtenidas en los 3 años anteriores. El análisis de estas cepas reveló que la WGS podía detectar de manera temprana un brote y además sugería que la transmisión desde la comunidad, un hecho que no había sido sospechado [349].

La WGS es un método reproducible, transferible y que no requiere librerías de cepas de referencia para la determinación de los aislados. A pesar de que todavía su coste y tiempo de respuesta limitan su uso de manera rutinaria, lo más probable es que en un futuro este sea el método de tipado más ampliamente adoptado [279].

7.3 Evaluación Endoscópica

La evaluación endoscópica vía colonoscopia o sigmoidoscopia fue de particular utilidad para el diagnóstico de la ICD previamente a la introducción de las pruebas de diagnóstico microbiológico en heces. La colonoscopia ha sido preferida con respecto a la sigmoidoscopia para el diagnóstico de la ICD, debido a que los hallazgos característicos de las pseudomembranas se limitan al colon derecho en aproximadamente un tercio de los casos [350].

Con la mejora de las pruebas diagnósticas sobre heces, el papel de las endoscopias para el diagnóstico inicial de la ICD ha disminuido, pero se mantiene de utilidad para excluir otras patologías, confirmar el diagnóstico, evaluar la gravedad y en ocasiones para administrar la terapia. En 2011, un estudio retrospectivo de 45 colonoscopias de 43 pacientes con ICD, Burk y cols. describieron que la indicación más común de la colonoscopia fue descartar otra patología (42%), para asistir en el diagnóstico en pacientes cuyos resultados en heces no fueron concluyentes (36%) y para realizar una posterior evaluación en pacientes con una mala evolución clínica (11%). De manera interesante, el 27% de los pacientes presentaba una mucosa normal. De los hallazgos anormales, el 49% presentó CPM y el 24% presentó una colitis inespecífica [351].

La colonoscopia puede ser de particular utilidad para excluir otros diagnósticos en una población seleccionada: pacientes inmunodeprimidos con citomegalovirus (CMV), enfermedad injerto contra huésped tras trasplante de médula ósea, en enfermedad inflamatoria intestinal, colitis isquémica o neoplasia en caso de sangrado del tracto gastrointestinal bajo [351]. En

pacientes con distensión colónica e íleo ha resultado de utilidad para la descompresión y colocación de un tubo largo para la irrigación con vancomicina. La colonoscopia también está siendo utilizada en la actualidad para el procedimiento del trasplante fecal [352].

7.4 Diagnóstico de Imagen

La evaluación radiológica se limita generalmente a radiografías abdominales y al TAC abdominal. La evidencia radiológica de una dilatación mayor de 6 cm del colon transversal o ascendente es consistente con el diagnóstico de megacolon. Las radiografías son también de utilidad para detectar aire libre o perforación. En un estudio de 152 pacientes con radiografías realizadas, el 32% fueron consideradas anormales y solo el 18% fueron diagnósticas (específicas para CPM) [353]. Perera y cols.[354], describieron variables del TAC consistentes con ICD incluyendo ascitis y megacolon (Figura 21), así como la utilidad para definir la extensión de la colitis. En pacientes críticos con múltiples comorbilidades también puede ayudar a esclarecer hasta qué punto está contribuyendo la ICD.

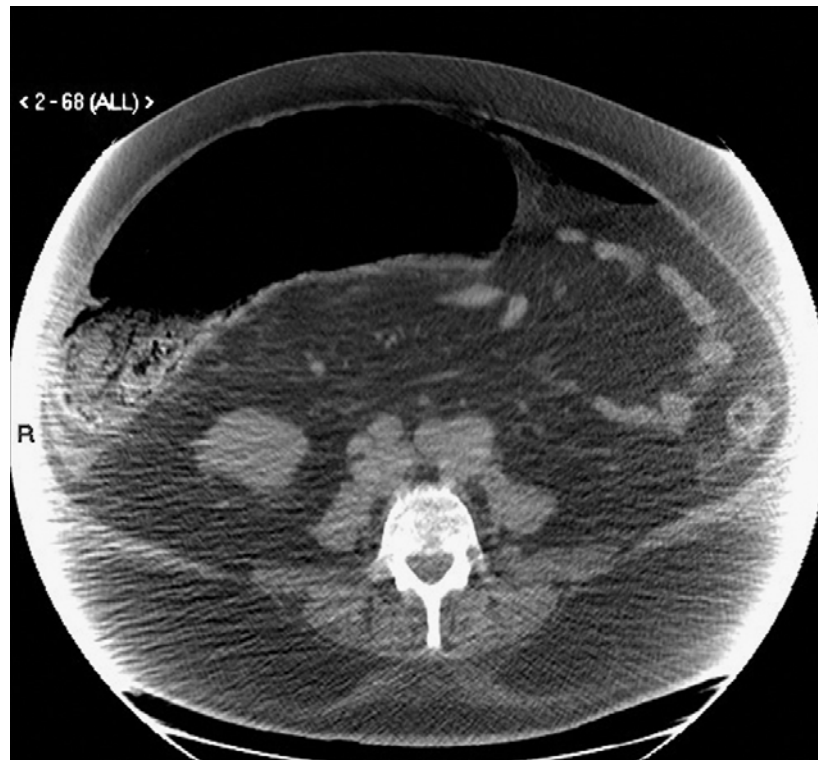


Fig 21. Megacolon tóxico con aire libre intraperitoneal en paciente con ICD.

A pesar de que no todas las autoridades están de acuerdo [213], el engrosamiento del colon (Figura 22) es un indicador bastante sensible de colitis fulminante [224, 225, 355]. El signo del acordeón, puede ser visto con el engrosamiento de la pared del colon y contraste intraluminal o aire (Figura 23).



Fig 22. Engrosamiento y colapso del colon en ICD, con contraste.

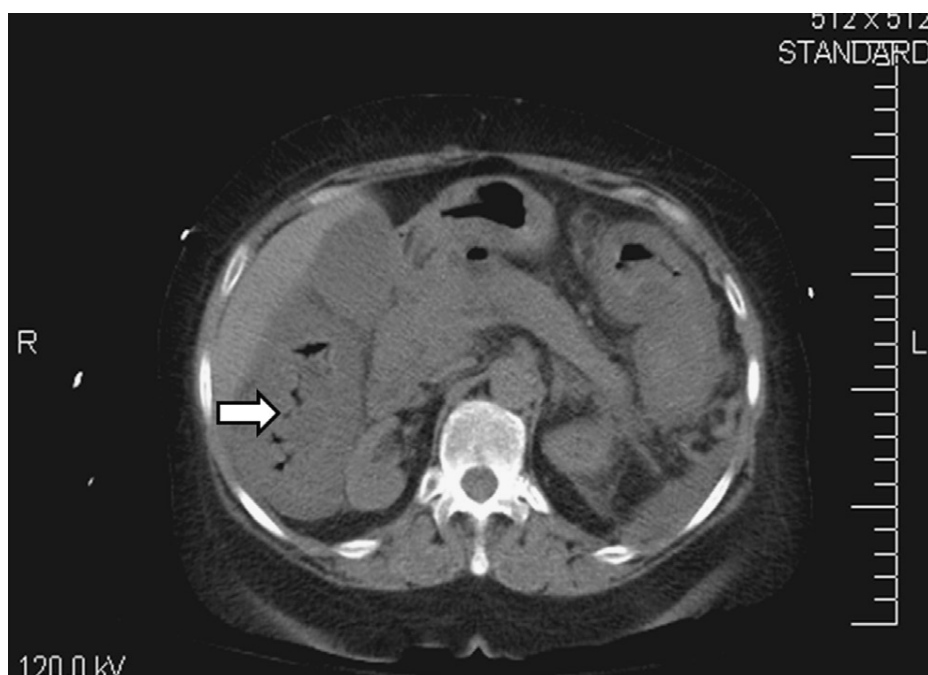


Fig. 23 Engrosamiento del colon con signo del acordeón (flecha blanca) sin contraste.

7.5 Diagnóstico Anatamopatológico

El diagnóstico también puede basarse en la evaluación macroscópica y microscópica de una muestra de biopsia o el colon resecado. El aspecto macroscópico de la muestra del colon puede revelar la colitis en cualquier localización del colon. Esta puede ser irregular, o estar confinada a un sólo segmento del colon. En los casos leves no se observan pseudomembranas, en cuyo caso el examen histológico revela una colitis activa focal con abscesos en las criptas, o incluso una histología normal [351].

Cuando la colitis es más grave, aparecen pseudomembranas como parches de 2-10mm de ancho, de color amarillo que, con el incremento de la gravedad, pueden unirse para cubrir grandes porciones de la mucosa (Figura 24).

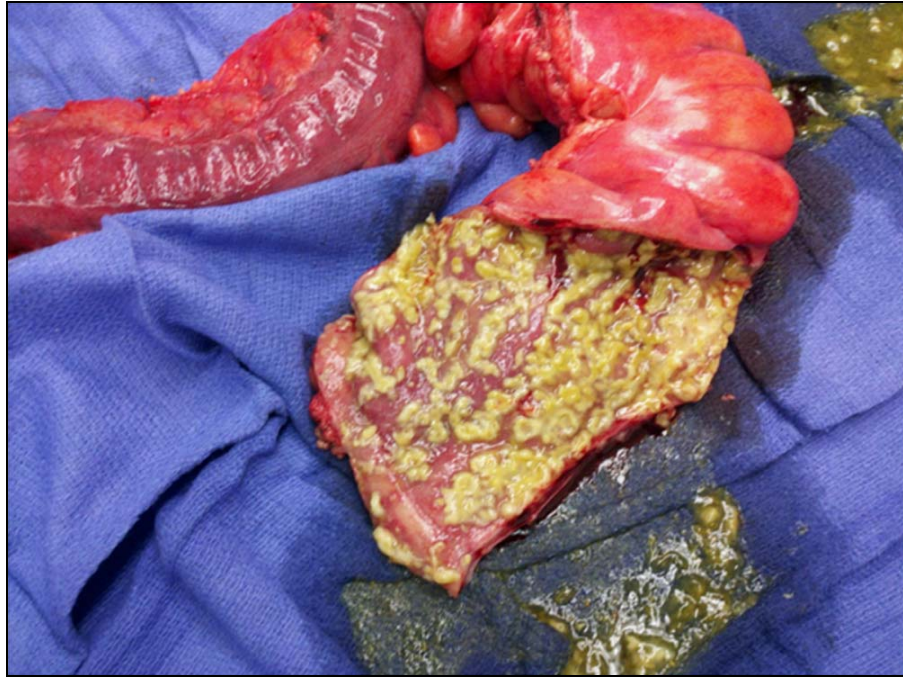


Fig. 24 Espécimen operatorio de paciente con CPM e ICD fulminante.

Las pseudomembranas constan de fibrina, mucina, y neutrófilos que también pueden dar lugar a dilatación de las criptas y lesiones tipo volcán (Figura 25). Aunque la gran mayoría de los casos de CPM son secundarios a la ICD, las pseudomembranas también pueden estar asociadas con EII, colitis isquémica, colitis pseudomembranosa colágena, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Shigella*, y CMV. Los pacientes hospitalizados con neutropenia, enterocolitis necrotizante relacionada a clostridios, también llamada enterocolitis neutropénica, pueden presentar pseudomembranas también. *C. septicum*, en lugar de *C. difficile*, se ha implicado en su fisiopatología [356]. Esta condición se puede distinguir clínicamente de la ICD en que está más comúnmente segmentada y afectando al colon derecho. Si el diagnóstico está en duda, el tejido del colon fijado en parafina puede ser evaluado por inmunohistoquímica o PCR tras ser extraída de la parafina [357].

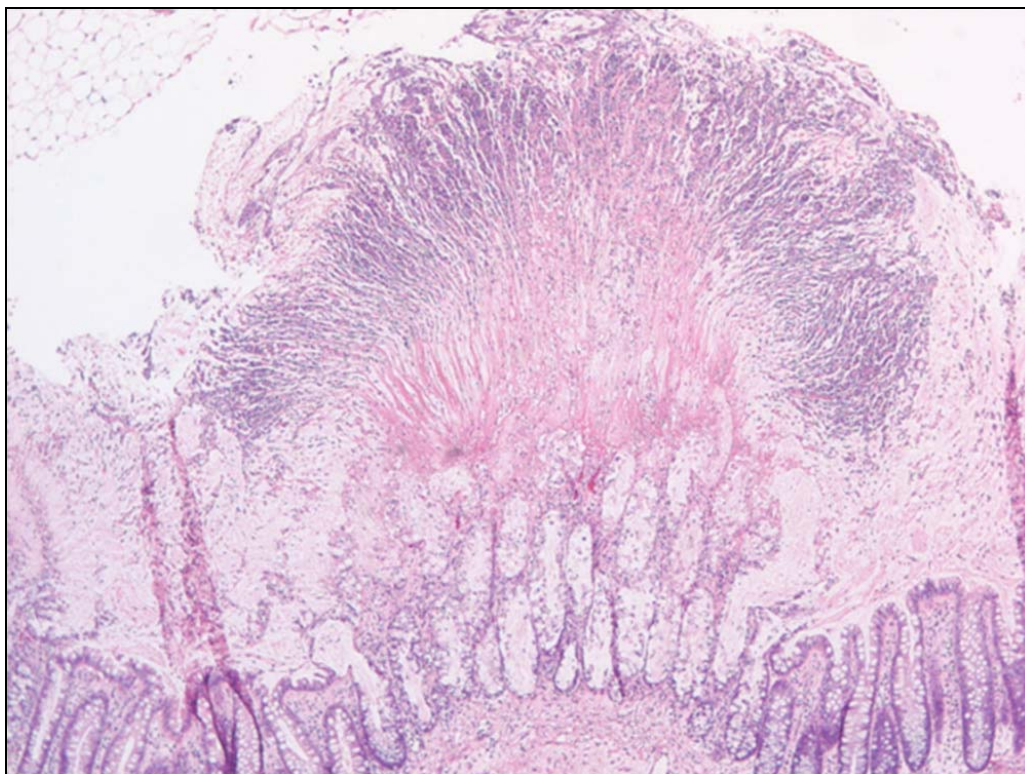


Fig 25. Lesión tipo volcán con pseudomembrana.

8. Tratamiento

Una vez que se diagnostica la ICD en un paciente, las medidas adicionales al tratamiento, incluyen la suspensión de antibióticos innecesarios, el adecuado reemplazo de fluidos y electrolitos, evitar el uso de medicación anti-motilidad e inhibidores de la bomba de protones [1, 358-361].

8.1 Tratamiento Médico

8.1.1 Antibióticos

Metronidazol y Vancomicina

Metronidazol y vancomicina han sido los antibióticos de elección por más de 30 años. Sin embargo, una reciente revisión de la Cochrane, ilustra los

problemas en cuanto a las decisiones del tratamiento antibiótico [362, 363]. Los autores, revisaron los ensayos controlados y aleatorizados de la terapia antibiótica para la ICD. Consideraron 15 estudios que incluían 1152 pacientes, de los que solamente hay un ensayo controlado con placebo, con un número de muestra pequeño y con una metodología de poca calidad. Los autores concluyeron que incluso las cuestiones más básicas como la efectividad del tratamiento antibiótico, y mucho menos cual es el tratamiento más adecuado, no pueden ser respondidas con un buen nivel de evidencia científica.

Teniendo en cuenta lo anterior, parece razonable revisar las ventajas y desventajas que presentan ambos tratamientos. Las razones por las que se prefiere el uso de metronidazol están basadas en el precio y en la aparición de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a la vancomicina (VRE) durante el tratamiento con vancomicina [263]. A pesar de lo anterior, los estudios comparativos entre fármacos no revelan diferencias estadísticamente significativas entre ambos [364, 365], en un estudio el 95% de los pacientes fueron curados con metronidazol y el 100% con vancomicina [364]. En un segundo estudio, la tasa de curación fue idéntica en ambos grupos (94%)[365]. Sin embargo, el número de pacientes no era muy elevado, y en ninguno de los estudios se estratificó por gravedad de la ICD.

A pesar de tener respuestas de curación similares, hay diferencias en cuanto a la farmacocinética que hacen que la balanza se incline hacia la vancomicina. El metronidazol se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal y es excretado por el sistema biliar, tan solo un 14% del fármaco se excreta a través de las heces [366]. Los niveles de metronidazol fecal parecen incrementar con la inflamación del colon, probablemente por trasudación hacia la luz, pero estos niveles descienden a medida que cesa la

inflamación y son indetectables en la recuperación [367, 368]. De forma más reciente, se ha observado desde 2004 tasas de respuesta más bajas y más lentas en los pacientes tratados con metronidazol [249, 369-372]. Musher y cols., observaron una tasa del 22% de fallo terapéutico con metronidazol [370], esto no fue debido a resistencia antibiótica ya que todas las cepas fueron sensibles. A pesar de lo cual, en este estudio no se observó, ninguna diferencia en cuanto a la evolución en aquellos pacientes en los que se continuó con metronidazol y los que fueron cambiados a vancomicina.

A pesar del potencial de metronidazol de presentar niveles bajos, en estudios *in vitro* ha demostrado ser rápidamente bactericida a concentraciones del orden de 8 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI), nivel que suele alcanzarse generalmente en el colon, mientras que la vancomicina solamente inhibe el crecimiento microbiano [373].

Vancomicina presenta prácticamente todas las cualidades necesarias para un tratamiento limitado a la luz del colon, alcanzando niveles de 1.000 µg/mL en heces, ya que no hay absorción desde el colon o es muy limitada [263]. Al-Nassir y cols. [374], han demostrado que vancomicina es más eficaz que metronidazol en la erradicación de *C. difficile* de las heces, para el día 5 de tratamiento los pacientes tratados con vancomicina tienen 3,3 veces más probabilidad de tener niveles indetectables de *C. difficile* que aquellos tratados con metronidazol ($p = 0.015$). Otros estudios han confirmado también otra ventaja de vancomicina respecto a metronidazol, como es la disminución del nivel de toxina expresado y del de células vegetativas [375, 376].

Otra cuestión es la inactivación de metronidazol por *Enterococcus faecalis*, que ha demostrado proteger a microorganismos que generalmente morirían con metronidazol [377]. También parece haber un mayor fallo

terapéutico con metronidazol cuando no se pueden discontinuar otros antibióticos [378].

Zar y cols. [264], realizaron el primer estudio aleatorizado, doble ciego controlado con placebo comparando metronidazol y vancomicina en pacientes estratificados por gravedad de la ICD. En este estudio la tasa de curación de los pacientes con enfermedad leve fue del 90% en ambos grupos, mientras que en los pacientes con enfermedad grave fue del 76% en los pacientes tratados con metronidazol vs 97% en aquellos tratados con vancomicina ($p= 0,02$). Los autores concluyeron que para la ICD leve los tratamientos eran igualmente efectivos, sin embargo vancomicina fue superior al metronidazol en el tratamiento de pacientes con ICD grave. Musher y cols. [370], sugieren que los pacientes con enfermedad grave pueden tener una menor circulación de sangre al colon, lo cual puede resultar en una menor trasudación del metronidazol en el lumen del colon y por ello una respuesta más lenta o fracaso terapéutico [379]. Para infecciones recurrentes, para ambos agentes se han observado tasas de curación menores [380].

Actualmente, las guías recomiendan distintos tratamientos según la estratificación de la gravedad de la ICD y las recurrencias [263]:(Figura 26)

- ICD inicial: No grave
- ICD Grave
- Primera Recurrencia o Riesgo de Recurrencia
- Recurrencias múltiples
- Tratamiento de la ICD cuando el tratamiento por vía oral no es posible.

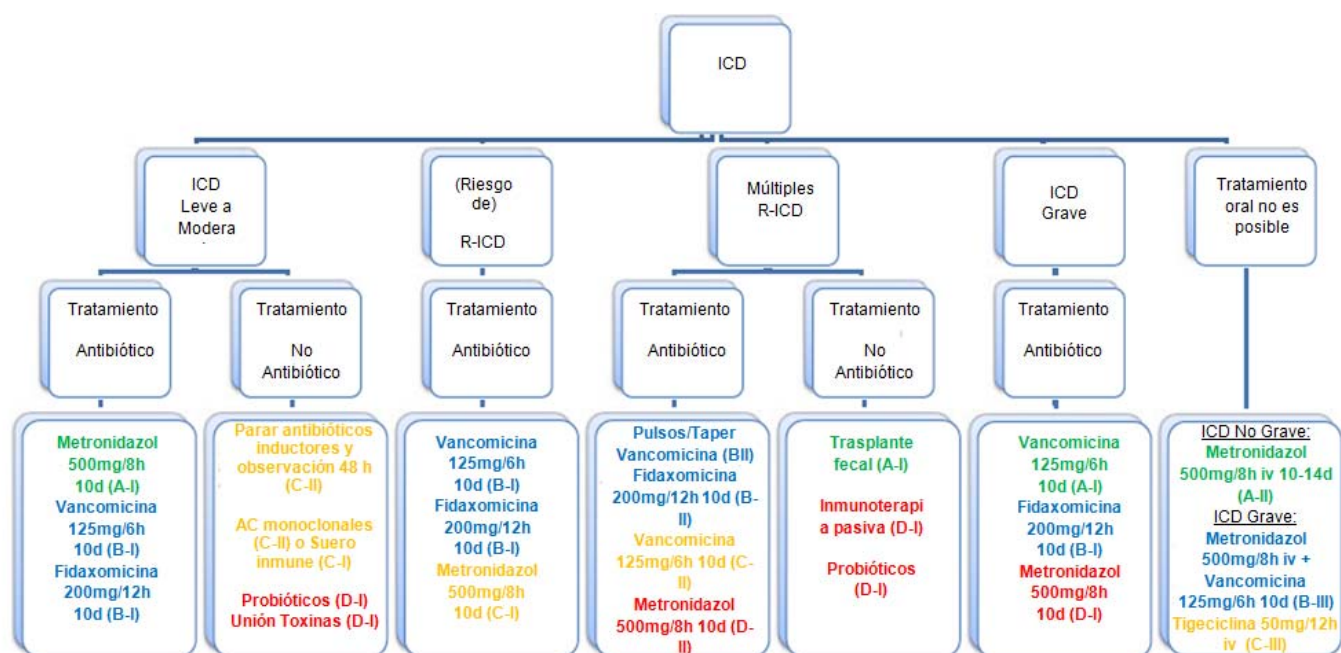


Fig. 26. Esquema de tratamiento de la ICD según gravedad y recurrencias

Fidaxomicina

Fidaxomicina es un nuevo agente antibiótico con un espectro de acción reducido, que ha sido recientemente aprobado para el tratamiento de la ICD [381, 382]. Es el primer miembro de una nueva familia de antibióticos llamados macrocíclicos (Fig. 27), presenta unas características que le hacen especialmente apropiado para este tipo de infección.

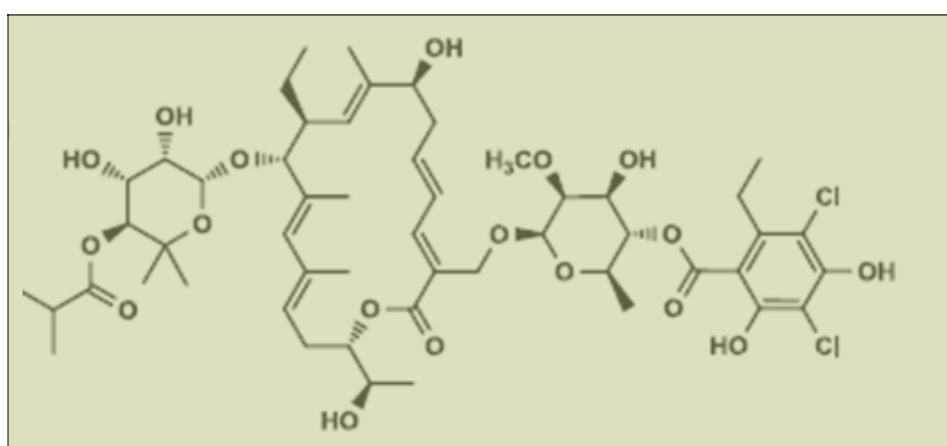


Fig. 27. Estructura química de la fidaxomicina

A diferencia de los tratamientos clásicos, tiene una actividad bactericida dirigida frente a *C. difficile* [383] y mínima actividad frente a otros constituyentes

de la microbiota intestinal, incluyendo *Bacteroides* spp. [23,24]. Esta propiedad puede permitir una rápida restauración de la microflora comensal del colon de los pacientes con ICD y puede reducir el riesgo de posterior colonización y sobrecrecimiento de *C. difficile* [381]. También presenta un efecto postantibiótico más prolongado que metronidazol y vancomicina [384]. Esto se traduce en el potencial de mantener un cierto grado de actividad antimicrobiana incluso cuando la concentración está por debajo de la CMI, siendo beneficioso en la ICD, una enfermedad en la que el rápido tránsito intestinal debido a la diarrea puede incrementar la eliminación de fármacos.

Fidaxomicina inhibe la actividad RNA polimerasa de las bacterias gram positivas en una fase temprana de la transcripción [385]. Al bloquear la transcripción de genes, tiene el potencial de inhibir la expresión de los genes causantes de la esporulación y la producción de toxina [386-388].

Además, comparado con vancomicina y metronidazol, presenta un menor riesgo de adquisición de VRE durante el tratamiento [389] Presenta baja absorción sistémica tras administración oral, alcanza altas concentraciones en el colon y ha demostrado una baja propensión al desarrollo de resistencias y resistencias cruzadas con otras familias de antibióticos [389, 390].

Fidaxomicina ha demostrado en los ensayos clínicos, en más de 1.000 pacientes [261, 391], ser no inferior a vancomicina en la respuesta inicial (Figura 28).

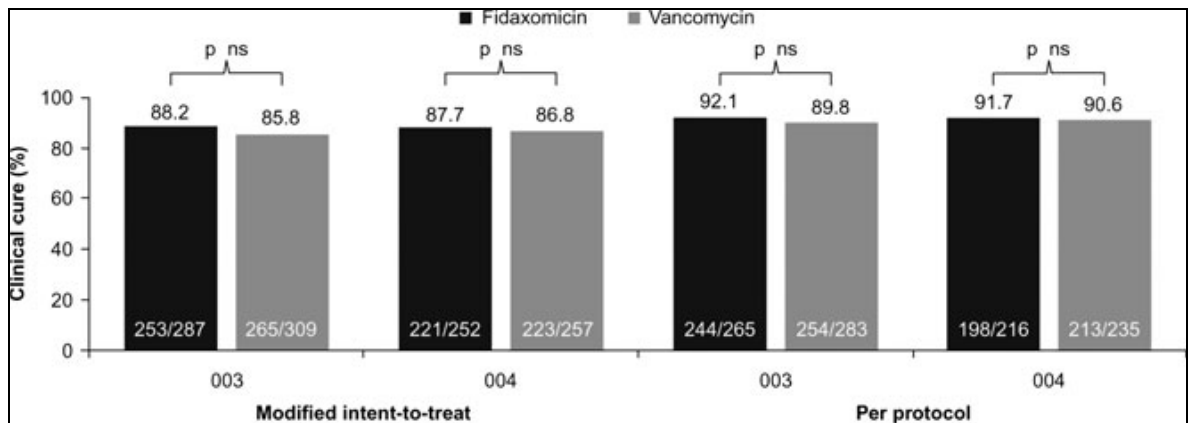


Fig. 28. Porcentaje de curación fidaxomicina vs vancomicina

Además, los pacientes tratados inicialmente con fidaxomicina eran menos propensos a tener recurrencias dentro de las cuatro semanas tras el tratamiento, lo que se tradujo en una superior respuesta sostenida a vancomicina (Figura 29).

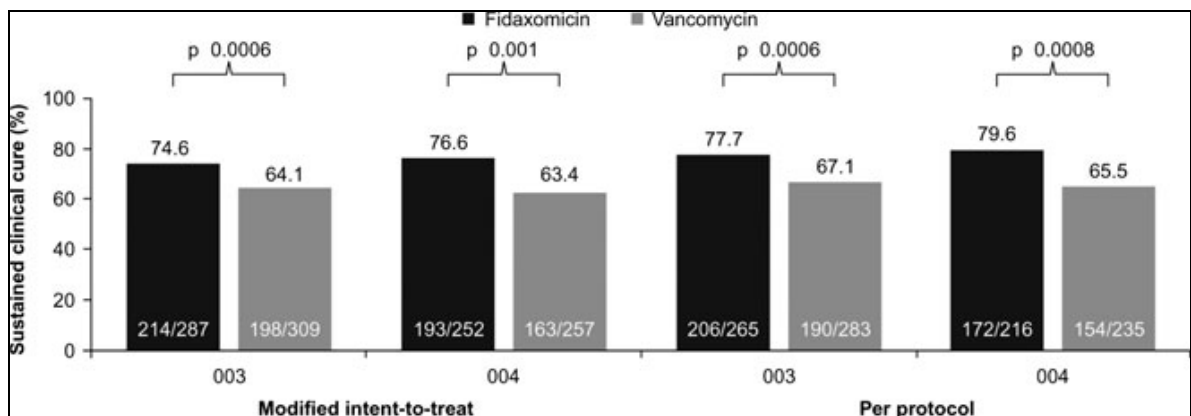


Fig. 29. Porcentaje de curación sostenida de fidaxomicina frente a vancomicina

Otros Antibióticos

Se han evaluado otros antibióticos más antiguos como tratamiento de la ICD, que incluyen bacitracina, teicoplanina y ácido fusídico [392-394]. Bacitracina y ácido fusídico, no han demostrado ninguna ventaja respecto a metronidazol o vancomicina. Teicoplanina ha presentado tasas de curación

similares a vancomicina [365, 392], siendo incluso más efectiva en la curación bacteriológica que vancomicina [392]. Sin embargo, teicoplanina no tiene disponible una formulación oral y además no tiene indicación aprobada para su uso en la ICD en Estados Unidos y países europeos.

Las indicaciones aprobadas para rifaximina son otras que la ICD, pero ha sido utilizada para el tratamiento de la ICD. Se comparó rifaximina con vancomicina en un estudio con pocos pacientes (20 pacientes) y demostró tener tasas de curación comparables con vancomicina [395]. De manera reciente, ha sido utilizada como tratamiento coadyuvante para el tratamiento de pacientes con múltiples (2-4 semanas de tratamiento tras un ciclo de vancomicina) recurrencias de ICD. En uno de los estudios se observó que no hubo más recurrencias en el 79% (11/14) de los pacientes tratados con rifaximina [396]. En otro estudio de 6 pacientes, en 5 de ellos no se volvió a dar una R-ICD tras el tratamiento coadyuvante de rifaximina [397]. Sin embargo, hay que tomar estos datos con precaución por el limitado número de pacientes y por la aparición de cepas de *C. difficile* con alto nivel de resistencia a la rifaximina, incluyendo 2 de los 3 pacientes que tuvieron una R-ICD tras la terapia adyuvante con rifaximina [396, 398].

Otra rifamicina, rifampicina, ha sido utilizada con buenos resultados, como tratamiento coadministrado con vancomicina en un reducido número de pacientes con R-ICD [399]. Un reciente estudio aleatorizado de rifampicina coadministrada con metronidazol en pacientes con un primer episodio de ICD, no demostró ningún beneficio adicional [372].

Nitazoxamida, aprobada para el tratamiento de la giardiasis y la criptosporidiasis, interfiere también con el metabolismo de bacterias anaerobias además del de protozoos. Este fármaco ha sido comparado con metronidazol y

vancomicina para el tratamiento de la ICD [400-402], con resultados de no inferioridad en uno de los estudios con mayor número de pacientes [400].

El tratamiento con tigeciclina intravenosa también ha sido descrito como un tratamiento eficaz en la ICD grave en una pequeña serie de casos (4 pacientes) y en el caso de un paciente [403, 404]. Se utilizó la tigeciclina como tratamiento coadyuvante para los pacientes que no habían respondido al metronidazol y vancomicina, en un caso se utilizó como tratamiento inicial. Las concentraciones fecales de tigeciclina parecen ser más elevadas que las de metronidazol, cuando se administra por vía intravenosa.

Fármacos en desarrollo: Surotomicina y Cadazolid

Surotomicina (conocida anteriormente como CB-183.315), es un nuevo antibiótico para el tratamiento de la ICD, es un lipopéptido, estructuralmente parecido a la daptomicina (Figura 30) [405]. Presenta un espectro de acción reducido, además de salvaguardar mucha de la microbiota normal intestinal, lo cual se ha relacionado con un menor riesgo de R-ICD y a tasas de curación más elevadas [406, 407].

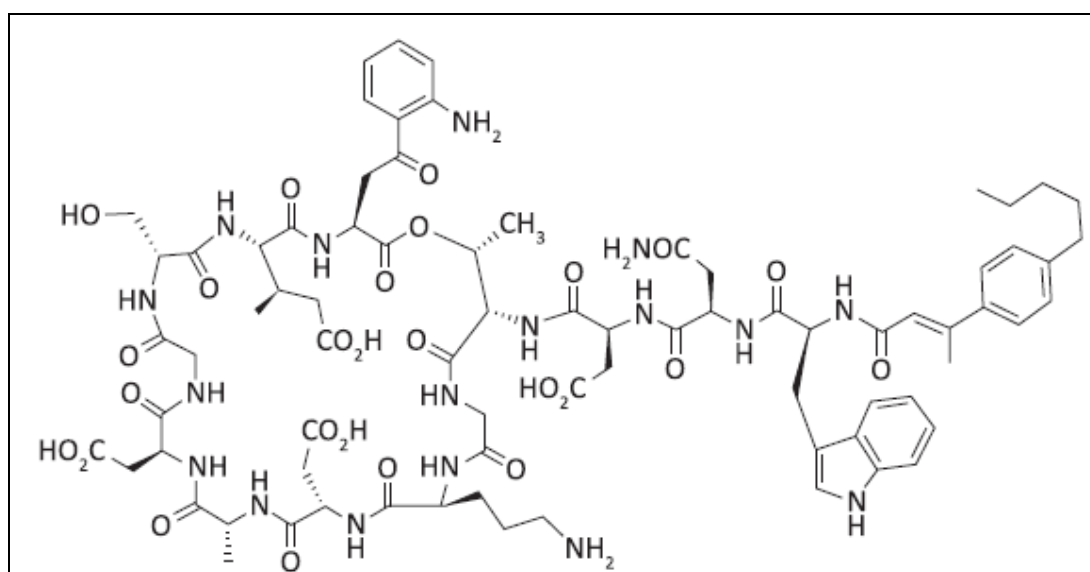


Fig. 30. Estructura química de la surotomicina

Surotomicina ha completado los ensayos de fase II, en los que presentó tasas de curación más elevadas y menos R-ICD que vancomicina [408]. Un estudio reciente, ha demostrado que la resistencia a surotomicina es poco probable en *C. difficile*, *E. faecalis*, y *E. faecium* [409]. Actualmente se encuentra en ensayos de fase III, con un régimen de 250mg, dos veces al día durante 10 días.

Cadazolid (antes conocido anteriormente como ACT-179811), es un nuevo antibiótico para el tratamiento de la ICD, su estructura química contiene tanto elementos de la familia de las oxazolidinonas como de las fluoroquinolonas (Figura 31).

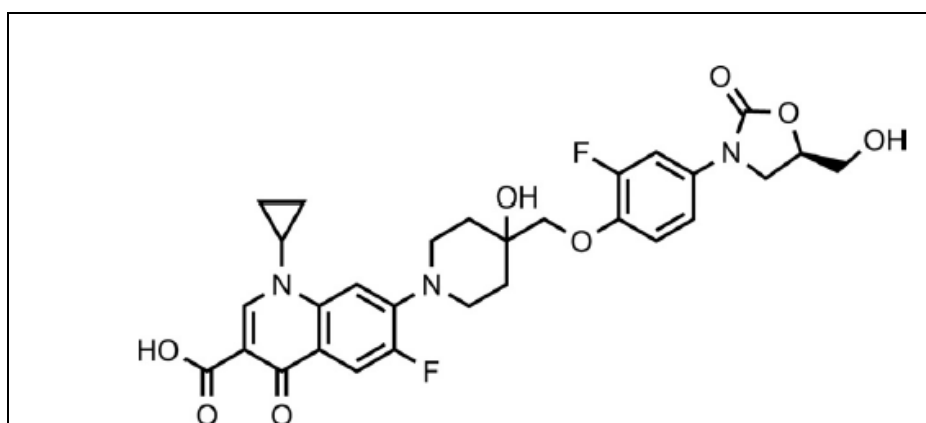


Fig. 31. Estructura química de cadazolid

Cadazolid ha demostrado una potente actividad *in vitro* frente a *C. difficile*. Su espectro de actividad se limita principalmente a bacterias Gram positivas con nula o mínima actividad frente a bacterias Gram negativas. Se encuentra actualmente en ensayo clínico de fase III [410-412].

8.1.2 Tratamientos Alternativos

Los tratamientos no antibióticos, pueden dividirse en tres grupos:

1. Neutralización intraluminal de las toxinas:

Los agentes de unión a las toxinas, como las resinas de intercambio aniónico colestiramina y colestipol, en un principio se pensó que podían ser beneficiosas en el tratamiento de la ICD. Sin embargo, un ensayo clínico de colestipol, controlado con placebo, no demostró ninguna ventaja respecto al placebo y la colestiramina demostró no ser efectiva en el modelo animal [413, 414].

Un sistema de unión de toxina A anclado a un soporte inerte (SYNSORB) fue evaluado en animales y también en humanos, pero los resultados en los pacientes no fueron publicados y esta aproximación fue descartada [415]. Otro prometedor agente era Tolevamer, pero los resultados de los estudios en fase III fueron marcadamente inferiores a metronidazol y vancomicina, aunque sí logró una menor tasa de R-ICD en aquellos pacientes que respondieron [416].

También se ha intentado esta aproximación con anticuerpos de las toxinas A y B generados tras vacunación de animales, a través de leche, huevos y administración por vía oral de los anticuerpos [417-425]. La inmunización de vacas y pollos con toxina A y B ha dado como resultado anticuerpos en leche y huevos, que al ser administrados por vía oral a hámsteres han demostrado ser protectores frente a la ICD [417, 418, 422].

Los derivados bovinos de inmunoglobulina G se ha observado que se degradan por las condiciones ácidas y por el tránsito por el tracto gastrointestinal humano, sin embargo se ha detectado actividad neutralizante de toxina en las heces y el fluido ileal humano [420, 421]. No se han comunicado ensayos exitosos de derivados de IgG bovinos y de pollos, para la prevención y tratamiento de la ICD, probablemente por la dificultad de

liberación de la dosis de IgG necesaria para el efecto neutralizante en el colon. De manera más reciente, las proteína del suero de leche procedente de vacas inmunizadas, han sido utilizadas con buenos resultados en la prevención de la R-ICD y como tratamiento primario [422, 424, 425], aunque no estos no son concluyentes.

2. Agentes Bioterapéuticos

A pesar de no ser tan efectivos en el tratamiento primario, los agentes bioterapéuticos son beneficiosos a la hora de restaurar la protección microbiana frente a la ICD, tras una disrupción de la misma por tratamientos antibióticos.

Los agentes llamados probióticos para la prevención y tratamiento de la ICD han tenido resultados no concluyentes o insatisfactorios. Sin embargo el trasplante fecal (inserción de una solución proveniente de la materia fecal de un donante en el tracto digestivo del paciente) ha demostrado ser altamente efectivo en el tratamiento de R-ICD ya sea administrado por colonoscopia [426-428], sonda nasogástrica [429, 430] o en forma de enemas [431]. De unos 200 casos comunicados, la tasa de éxito ha sido del 96% [432]. Recientemente, se ha realizado un estudio en el que se demuestra la superioridad del trasplante de microbiota fecal frente a vancomicina en el tratamiento de la R-ICD[433].

Este procedimiento está recomendado con grado de evidencia A-1 por la Sociedad Europea de Microbiología y Enfermedades Infecciosas para el tratamiento de las recurrencias múltiples de la ICD [263].

La identificación de microorganismos específicos no ha sido exitosa por el momento, aunque sí lo ha sido una mezcla sintética de varias bacterias, resultando ser protectora frente a R-ICD en un estudio no controlado [434]. Se conoce desde hace ya 125 años, que la administración de *C. difficile* no toxigénico a hámsteres, previene frente a la ICD cuando son posteriormente administrados cepas toxigénicas de *C. difficile* [435-437]. También se ha demostrado que la colonización asintomática de *C. difficile* (toxigénico o no toxigénico) está asociada a un menor riesgo de ICD [210], aunque el mecanismo por el cual esto sucede no ha sido dilucidado todavía [435].

3. Anticuerpos

Las terapias basadas en inmunización pasiva y activa frente a las toxinas de *C. difficile* asumen que la respuesta inmune frente a *C. difficile* o sus toxinas confiere protección frente la colonización o la ICD. La antitoxina A no previene la colonización, pero sí parece proteger frente al desarrollo de la enfermedad [71, 438-440]. Existen algunos datos contradictorios de estudios en los que no se demostró ninguna asociación entre los niveles de anti-toxina A y enfermedad [6], y otros que demuestran que la antitoxina B tiene una mejor correlación con la protección [441]. El factor de riesgo asociado a la edad apoyaría el papel que juega la inmunidad humoral [6]. Por tanto, estas estrategias presentan una potencial aplicabilidad para la prevención y el tratamiento de la ICD.

- **Inmunoglobulinas intravenosas (IVIG)**

La potencial utilidad de las IVIG para el tratamiento de la ICD se apoya en estudios que demuestran que las antitoxinas A o B o ambas están presentes

en el 64% y 66% de los adultos sanos [442]. Estos datos proporcionan la justificación para que la terapia con IVIG haya sido utilizada de manera esporádica desde 1991. Los datos de un ensayo controlado [442], y metaanálisis de los estudios llevados a cabo [443], concluyen que falta evidencia que apoye el uso de las misma, en parte debido a la falta de consenso en las indicaciones, dosis o datos procedentes de ensayos con un correcto formato.

- **Anticuerpos monoclonales**

La protección inmune ha sido probada en un estudio aleatorizado que utilizaba anticuerpos neutralizantes monoclonales humanos frente a las toxinas A y B para prevenir la R-ICD en 200 pacientes [444]. El porcentaje de recurrencia fue del 7% vs el 25% ($p < 0,001$) a favor del tratamiento con los anticuerpos monoclonales. Este tratamiento no se encuentra disponible actualmente ya que se encuentra en marcha un nuevo ensayo clínico de fase III.

8.2 Tratamiento Quirúrgico

Las guías del 2013 de la Asociación Americana de Gastroenterología define signos y síntomas en la ICD grave que requieren de una consulta a cirugía, las cuales incluyen hipotensión que requieren terapia vasopresora, signos clínicos de sepsis, disfunción orgánica, alteraciones del estado mental, recuentos de leucocitos de $50.000 \text{ células/mm}^3$, lactato de 5 mmol/L o ICD complicada que no mejora tras 5 días con el tratamiento médico [358].

La falta de respuesta al manejo médico incluyendo la sepsis persistente, dilatación intestinal de más de 10cm y perforación intestinal son indicaciones para la intervención quirúrgica. El manejo quirúrgico recomendado es la colectomía subtotal con ileostomía terminal, asociadas a una reducción en la mortalidad en la ICD fulminante [445].

De manera más reciente, Neal y cols.[446], estudiaron una alternativa a la colectomía total, una derivación de ileostomía en asa seguido de un lavado colónico intraoperatorio con una solución caliente de 8L de polietilenglicol y electrolitos a través de la ileostomía. También realizaron una instilación postoperatoria anterograda. Al comparar con controles históricos pareados, la mortalidad se redujo del 50% al 19%. El retraso en la reversión de la ileostomía, tras recuperación del episodio agudo, resultó en la preservación del colon en el 93% de los casos.

9. Prevención y Control

Una vez que se diagnostica la ICD en un paciente, la aplicación inmediata de medidas apropiadas de control de la infección es obligatorio para evitar la propagación. Estas medidas incluyen el diagnóstico precoz de la ICD, la vigilancia, la formación del personal, el uso adecuado de precauciones de aislamiento, higiene de las manos, la ropa de protección, saneamiento ambiental y la limpieza de los equipos médicos, el manejo adecuado de antibióticos, y medidas específicas durante los brotes. Las medidas para la prevención y control de ICD ("enfoque de paquete") han sido descrito en una guía ESCMID por Vonberg et al. [447].

C. difficile puede transmitirse por contacto directo con una persona infectada, por contacto con el ambiente contaminado y a través de las manos del personal sanitario. Los pacientes con incontinencia fecal son aquellos que presentan el mayor riesgo de contaminación del ambiente con esporas de *C. difficile*. El nivel de contaminación está en relación con el grado de gravedad de la ICD [448]. La tasa de adquisición de *C. difficile* se incrementa de forma lineal durante la hospitalización, pudiendo alcanzar niveles de hasta el 40% tras 4 semanas de hospitalización [240]. Puede que no exista un único método que sea efectivo por si solo en reducir el riesgo de adquisición de la ICD, generalmente se requiere de un conjunto de medidas que varían en función del tipo de epidemiología y de los recursos disponibles en cada institución [449-452]. A continuación se detallan las estrategias de prevención y control de la ICD más importantes.

9.1. Precauciones de Contacto

Dado el importante papel que juegan los pacientes y el entorno, la rápida implementación de precauciones de contacto es crítica. La estricta adherencia a las precauciones de contacto es necesaria para prevención de la transmisión. Estas medidas incluyen [448]:

- Aislar al paciente en una habitación individual o cuando no sea posible con otro paciente con ICD.
- Uso de bata y guantes
- Uso de material o equipo médico exclusivo para el paciente o si no es posible el material debe ser correctamente desinfectado entre cada paciente.

- Comunicación del estado de aislamiento del paciente si este es referido a otra unidad.

En las situaciones en las que el aislamiento no pueda realizarse en una habitación individual, se debe mantener una distancia al menos de un metro entre las camas de los pacientes, utilizar cinta de color o cualquier otro marcador visual para demarcar la "zona de aislamiento".

Como mínimo, se deben mantener las precauciones de contacto hasta la resolución de la diarrea, actualmente los expertos recomiendan mantener el aislamiento hasta 48 horas después del cese de la misma [453].

La adherencia del personal a estas medidas u a otras medidas de prevención debe ser monitorizada y se deben mostrar los resultados de la misma con el personal y jefes de la institución [448].

9.2. Higiene de Manos

Otra intervención para prevenir la transmisión de la ICD es la adherencia a los protocolos de higiene de manos por parte del personal sanitario, el paciente y visitantes del paciente. Se recomienda el lavado con agua y jabón, ya que las soluciones alcohólicas no tienen actividad esporicida. El beneficio del lavado de manos se basa en el arrastre físico de los microorganismos [448, 454].

9.3 Limpieza del Ambiente

Como se ha mencionado anteriormente, el ambiente juega un papel importante en la transmisión de la ICD. Tanto los pacientes sintomáticos como asintomáticos liberan bacterias de *C. difficile* en las heces, las cuales pueden contaminar superficies. Las esporas de *C. difficile* pueden sobrevivir hasta 5

meses en superficies sólidas, actuando como reservorios para la transmisión de la infección [275, 276].

La contaminación ambiental se relaciona con la expansión de *C. difficile* a través de objetos contaminados. Se ha aislado la bacteria en distintos aparatos que están en contacto con los pacientes, como termómetros electrónicos [455]. El grado de contaminación de un área aumenta con el número de pacientes que tienen diarrea por *C. difficile* [243]. Cuanto mayor sea la contaminación del ambiente, mayor es el riesgo de la contaminación de las manos del personal sanitario que pueden actuar como vehículo de transmisión [456]. En un estudio de una unidad geriátrica se observó un 14% de muestras ambientales positivas, siendo las zonas más contaminadas el suelo y los baños [457]. Los puntos de superficies de alto contacto y por tanto contaminación se muestran en la figura 32.



Fig. 32. Puntos de elevado contacto de las habitaciones de pacientes con ICD

Las formas vegetativas de *C. difficile* son fácilmente eliminadas por su exposición al aire, pero las esporas son resistentes a la mayoría de los desinfectantes usados comúnmente, persistiendo en el ambiente durante largos periodos de tiempo [448]. Los desinfectantes que se utilizan generalmente en las instituciones sanitarias son los compuestos de amonio cuaternario y fenólicos, ninguno de ellos presenta actividad esporicida [458, 459]. Algunos desinfectantes pueden incluso favorecer la esporulación de *C. difficile*.

Para la limpieza de las áreas y objetos contaminados es efectivo el uso de hipoclorito sódico, glutaraldehído alcalino, y óxido de etileno [129, 456].

Actualmente, existen otros métodos (los llamados "métodos sin tocar") que han demostrado su eficacia como la desinfección por luz UV, vaporización de peróxido de hidrógeno o superficies auto-desinfectantes (superficies con recubrimientos de cobre) [460].

9.4 Programas de Control de Antibióticos

Un programa de control de antibióticos es otro de los componentes importantes de la prevención de la ICD. Es fundamental el establecimiento de una política de antibióticos, para asegurar que el uso de éstos sea controlado estrechamente. En general, las medidas más importantes a tomar serían las siguientes [461]:

- Reducción del uso de antibióticos innecesarios.
- Estudios apropiados de sensibilidad a los antimicrobianos utilizados.
- Suspensión del tratamiento antibiótico lo antes posible.

- Reducción de la utilización de antibióticos de amplio espectro.
- Restricción del uso de antibióticos más comúnmente asociados a la diarrea por *C. difficile*.

Varios estudios han demostrado una disminución de casos de ICD al restringir el uso de un determinado antibiótico o en general, al cambiar totalmente la política de antibióticos que se llevaba a cabo [231], [462], [463], [464].

9.5 Vacunación

Una de las aproximaciones para la prevención podría ser el desarrollo de una vacuna efectiva frente a la ICD. Los toxoides A y B parecen los mejores candidatos para una vacuna, ya que son capaces de inducir una excelente respuesta de anticuerpos séricos en adultos sanos [465].

Sanofi Pasteur ha desarrollado una vacuna compuesta por un preparado inactivado y purificado de toxoides A y B. Esta vacuna se administra vía intramuscular en un volumen de 0,5ml. Se encuentra en marcha un ensayo en fase III, en el que el objetivo primario es evaluar la eficacia de la vacuna en la prevención de la ICD primaria en adultos mayores de 50 años. En este ensayo los pacientes recibirán la vacuna en el día 0, 7 y 30. El ensayo está previsto que finalice en diciembre del 2017.

Gardiner y cols. han comunicado un primer informe sobre una vacuna ADN, en el que describen que el dominio de unión al receptor de la toxina A es capaz de inducir una respuesta inmune en ratones y protegerles de la muerte. Esta vacuna todavía debe ser evaluada en ensayos clínicos [466].

CARENCIAS DE LA LITERATURA

Desde el descubrimiento de *Clostridium difficile*, la enfermedad causada por este microorganismo se ha asociado muy particularmente a pacientes ancianos previamente tratados con antibióticos y que con frecuencia habían sido recientemente intervenidos quirúrgicamente [7, 19].

Posteriormente los brotes de la infección por cepas del ribotipo 027, pusieron de manifiesto que podían faltar uno o más de dichos factores de riesgo. En años recientes, se acepta que un porcentaje sustancial de los episodios de ICD son casos que ocurren en pacientes no hospitalizados [2], por lo que se conoce mal cuales son los factores predisponentes reales de dicha población y la proporción de casos que han mantenido un contacto con la asistencia sanitaria.

Por otra parte, los datos de incidencia de la mayoría de los países e instituciones se hacen contabilizando los casos nosocomiales de centros donde *C. difficile* no se busca sistemáticamente en pacientes no hospitalizados.

La frecuencia de recurrencias de ICD es mayor en pacientes graves pero se desconoce realmente los datos que precozmente pueden orientar hacia una población con mayor o menor riesgo de recurrencias. Los datos clínicos tienen solo una capacidad limitada de predicción.

Es necesario, por tanto, añadir a los criterios clínicos tradicionales, elementos objetivos que predigan la mala evolución como es el caso de la cantidad de microorganismo y de toxina presentes, su poder patógeno y la respuesta de los mecanismos de defensa del huésped.

Se conoce bien la hipertoxigenicidad de algunos ribotipos como el 027, pero se desconoce la patogenicidad de otros ribotipos. Se ha descrito un incremento en cepas de ribotipo no-027 que contienen genes para la toxina A y

B y genes para la toxina binaria, las implicaciones clínicas de estos hallazgos son hasta ahora desconocidas [20, 21].

OBJETIVOS

Los objetivos perseguidos pueden resumirse en los siguientes puntos:

Objetivo 1. Describir la epidemiología de *C. difficile* en una institución en el que la búsqueda de *C. difficile* se aplica de manera universal a todas las muestras de heces no formes de cualquier origen.

Objetivo 2. Comparar la ICD de origen comunitario con las ICD de adquisición relacionada con la asistencia sanitaria.

Objetivo 3. Evaluar la importancia de la evolución en la ICD y determinar los factores de riesgo que permiten predecir la misma clínicamente.

Objetivo 4. Evaluar la contribución que puedan tener en el pronóstico de mala evolución de la ICD distintos factores microbiológicos del microorganismo y la respuesta inmune del paciente.

Objetivo 5. Evaluar el comportamiento clínico y evolución de la ICD en relación a los distintos ribotipos encontrados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Procesamiento de las muestras para el diagnóstico de la ICD

Durante todo el periodo de estudio (periodo de inclusión de nuevos casos: enero a junio del 2013; periodo de seguimiento: hasta el 22 de octubre del 2013), se procesó para diagnóstico de ICD cualquier muestra de heces recibida en el laboratorio independientemente de la solicitud clínica que la acompañó. El laboratorio de Microbiología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón recibe las muestras de heces no formes de, prácticamente, toda la población del Área Sanitaria 1 de Madrid que engloba aproximadamente unas 715.000 personas. A las muestras no formes hospitalarias hay que añadirles las muestras de 13 centros de salud y de 2 hospitales de rehabilitación. Se excluyeron las muestras de heces transportadas en formol (parásitos) y las muestras formes. En pacientes con íleo paralítico o megacolon fueron aceptados exudados rectales o biopsias de colon. Tras la aceptación de las muestras se numeraron y se realizaron las siguientes acciones:

1.1.- Realización de prueba rápida de detección de *C. difficile* toxigénico (CDT).

La prueba rápida de detección se aplicó sobre aquellas muestras con petición expresa de búsqueda de *C. difficile*. La prueba consiste en un algoritmo diagnóstico basado en una detección inmunocromatográfica de antígenos (C Diff Quik-Chek Complete TechLab, Blacksburg, VA) y en una PCR a tiempo real del gen de la toxina B (Xpert™ *C. difficile*).

C.Diff Quick-Check Complete:

Esta prueba utiliza anticuerpos específicos frente a la glutamato deshidrogenasa y las toxinas A y B de *C. difficile*. El dispositivo contiene una ventana de reacción con tres líneas verticales con anticuerpos inmovilizados. La línea de antígeno (“Ag”) de la prueba contiene anticuerpos frente a la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*. La línea de control (“C”) es una línea de puntos que contiene anticuerpos anti-peroxidasa de rábano picante. La línea de toxinas A y B (“Tox”) de la prueba contiene anticuerpos frente a las toxinas A y B de *C. difficile*. El conjugado consiste en anticuerpos frente la glutamato deshidrogenasa y anticuerpos frente a las toxinas A y B unidos a la peroxidasa de rábano.

Para realizar la prueba, la muestra se añade a un tubo que contiene una mezcla de diluyente (750 µl) y conjugado (1 gota). La mezcla muestra-conjugado diluida se transfiere (500µl) al pocillo de muestra y el dispositivo se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se lava la ventana de reacción con el tampón de lavado (300 µl) y se deja que se absorba completamente. Después se añade el sustrato (2 gotas) a la ventana de reacción.

Tras una incubación de 10 minutos, se comprueba visualmente en la reacción “Ag” la aparición de una línea azul vertical en el lado “Ag” de la ventana de reacción. La presencia de una línea azul indica un resultado positivo. Si el “Ag” es positivo, entonces debe comprobarse visualmente en la reacción “Tox” si aparece una línea azul en el lado “Tox” de la ventana de reacción. La presencia de una línea azul indica un resultado positivo. Una reacción positiva “C” de la ventana de reacción confirma que la prueba funciona adecuadamente y que los resultados son válidos (Figura 33).



Fig. 33. Prueba C.Diff Quick-Check Complete positiva

Xpert C. difficile PCR:

Xpert *C. difficile* detecta la presencia de *Clostridium difficile* toxigénico en menos de una hora mediante la amplificación del gen *tcdB* que codifica la toxina B de este microorganismo. Además, esta técnica detecta los genes que codifican la toxina binaria (*cdt*) y una delección específica del gen *tcdC* característica de la cepa epidémica 027/NAP/BI.

El sistema GeneXpert automatiza e integra la purificación de muestras, la amplificación del ácido nucleico y la detección de las secuencias objetivo en muestras sencillas o complejas mediante ensayos de PCR y RT-PCT en tiempo real. El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal y software cargado previamente para la realización de las pruebas con las muestras recogidas y la visualización de los resultados (Figura 34).



Fig.34. Sistema de GeneXpert

El sistema requiere el uso de cartuchos desechables GeneXpert de un solo uso que contienen los reactivos para la PCR y en los que llevan a cabo los procesos de extracción de ADN y PCR (Figura 35). Dado que los cartuchos son

independientes, se elimina el riesgo de contaminación cruzada entre muestras.



Fig. 35. Cartucho desechable GeneXpert

El ensayo Xpert *C. difficile* incluye reactivos para la detección del gen de la toxina producida por *C. difficile* y la toxina producida por *C. difficile*, presumiblemente 027/NAP1/BI respectivamente, así como para el control del procesamiento de las muestras (CPM). El CPM es necesario para el procesamiento adecuado de las bacterias diana y para controlar la presencia de inhibidores en la reacción de la PCR. Mediante la función de comprobación de sonda (PCC, por sus siglas en inglés), se comprueba la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo.

Los cebadores y sondas del ensayo Xpert *C. difficile* detectan secuencias de los genes de la toxina B (*tcdB*) y la toxina binaria (*cdt*), y del *tcdC* con la delección nt 117 (*tcdC*Δ117).

La técnica se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se introdujo una torunda en la muestra de heces y a continuación se introdujo en el vial del reactivo de elución. Éste se agitó durante unos 10 segundos y todo el líquido se transfirió al pocillo S del cartucho utilizando una pipeta larga. Después, el reactivo 1 se trasvasó al pocillo 1 del cartucho. Finalmente, el reactivo 2 se añadió al pocillo 2 del cartucho y se cerró la tapa del mismo

(Figura 36). El código de barras del cartucho se escaneó y se colocó en el instrumento Gene Xpert.

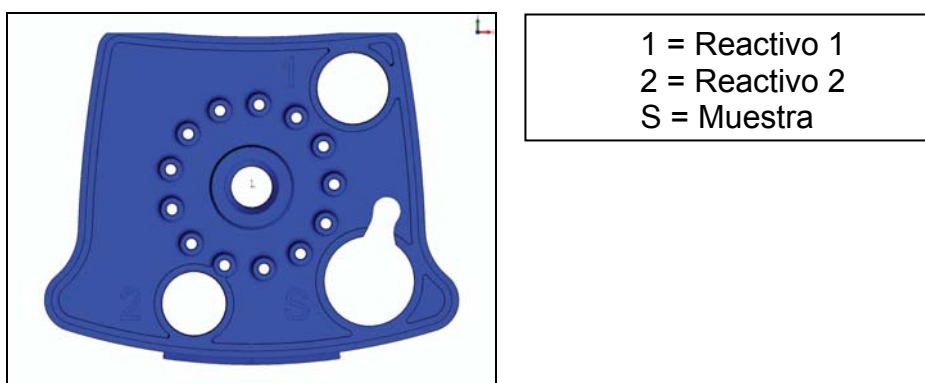


Fig. 36. Pocillos del Cartucho GeneXpert

Algoritmo QCC y Xpert (GDH seguido de PCR):

El algoritmo consta de los siguientes pasos: la técnica Quik Check Complete se utilizó como técnica inicial de cribado sobre todas las muestras incluidas en el estudio. Los resultados negativos del GDH (independientemente del resultado de las toxinas) fueron considerados como negativos definitivos mientras que aquellos resultados positivos del GDH que iban acompañados de un resultado positivo (no débil) de las toxinas fueron considerados como positivos definitivos. En el resto de muestras, es decir, en aquellas en las que se obtuvo un resultado de GDH positivo y un resultado de las toxinas negativo o débilmente positivo (Figura 37), se les realizó una prueba molecular mediante el sistema Xpert. El resultado obtenido por el Xpert fue considerado definitivo.



Fig.37. Resultado GDH positivo y Toxina negativa del sistema Quik Check Complete

1.2.- Cultivo toxigénico de las muestras en medio selectivo de agar *Clostridium* (bioMeriéux).

Se realizó a todas las muestras de heces no formes recibidas independientemente de la solicitud clínica, si el procesamiento no fue inmediato, se conservaron las muestras a 4°C. La siembra se realizó con asas desechables de forma cualitativa en placas de agar *Clostridium* (bioMeriéux). Las placas sembradas se incubaron 48 horas en jarras de anaerobiosis a 37°C.

Transcurrido el periodo de incubación, se procedía a la lectura de las placas. Con la ayuda de una lupa binocular, se seleccionaron los distintos morfotipos coloniales compatibles con *C. difficile* (colonias grandes, rugosas e irregulares y con un característico olor a caballeriza) (Figura 38).



Fig.38. Cultivo de heces en el que se observan colonias de *C.difficile*

La identificación final de las colonias sospechosas de ser *Clostridium difficile* toxigénico (CDT) se realizó mediante el sistema inmunocromatográfico (C Diff Quik-Chek Complete, TechLab, Blacksburg, VA) y el ensayo de

citotoxicidad en línea celular MRC-5. Si el resultado de la citotoxicidad directa sobre heces era negativo siendo positivo el sistema inmunocromatográfico, se introducían varias de estas colonias en un caldo de enriquecimiento BHI (Brain Heart Infusion) y se incubaba 24 horas a 35°C en anaerobiosis. Tras la incubación se le realizaba una prueba de citotoxicidad ("second look") procediendo de la misma manera que cuando se realiza la citotoxicidad directa, que se explica en el siguiente punto.

1.3.- Citotoxicidad directa sobre muestra.

Para la realización de este ensayo se inoculó aproximadamente 0.5 ml de heces en 2 ml de PBS (dilución final $\frac{1}{4}$). Los tubos inoculados se centrifugaron a 3500g durante 15 min, filtrando posteriormente 1 ml del sobrenadante a través de filtros de 0.22 μ m, y añadiendo este filtrado a tubos de cultivo celular preparados (shell-vial). Los shell-vial contenían fibroblastos de la línea celular MRC-5, en un medio de mantenimiento (MEM con 2% de suero fetal bovino).

A las 24 y 48 horas de incubación a 37° C, se observaron los cultivos celulares mediante un microscopio de inversión. El efecto citotóxico (resultado positivo), se detectó al observar las células del cultivo redondeadas y separadas, rompiendo la monocapa.

Como control de inespecificidades del efecto citotóxico, se inoculó la muestra, de forma paralela, con 1 ml de antitoxina B de *C. difficile*. Estos cultivos debían resultar siempre negativos, pues la antitoxina bloquea la acción de la toxina B, impidiendo el efecto citotóxico (Figura 39).

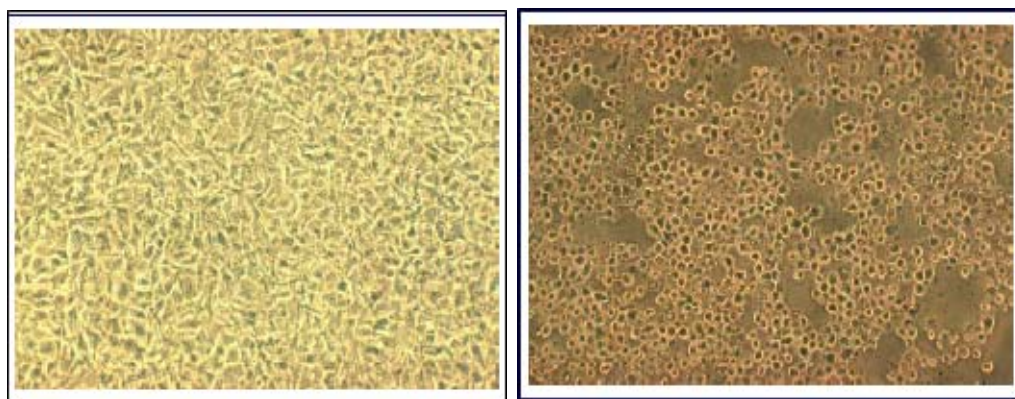


Fig.39. Resultado de citotoxicidad positivo (izquierda) y negativo (derecha)

Se consideró como resultado positivo para CDT cualquier muestra que tenga un resultado positivo por cualquiera de las técnicas de referencia (cultivo toxigénico o citotoxicidad directa en heces).

2. Selección de pacientes con ICD y seguimiento

Durante el periodo de enero a junio del 2013, ante la detección de un CDT en el laboratorio se identificó al paciente afectado y si se trataba de un paciente sin ningún episodio previo en los 2 meses anteriores (un nuevo episodio) se procedió a incluirle en el estudio. Se excluyeron del estudio a los menores de 2 años o pacientes con <3 evacuaciones no formes a lo largo de las últimas 24 horas.

A los pacientes incluidos se les hizo un seguimiento protocolizado de la enfermedad durante todo el periodo de inclusión y a lo largo de los 2 meses posteriores al último episodio de recurrencia ICD. El periodo de seguimiento finalizó para el último paciente el 22 de octubre del 2013.

3. Definiciones

Un episodio de ICD se definió como la presencia de un resultado positivo de *C. difficile* toxigénico y la presencia de diarrea (≥ 3 deposiciones de características diarreicas en 24 horas) o hallazgos colonoscópicos sugerentes de colitis pseudomembranosa.

El tipo de episodio según el lugar de potencial adquisición y comienzo del mismo se definió como indica el grupo de estudio de la ICD de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas [26].

ICD de adquisición relacionada con la asistencia sanitaria (H-ICD):

- Episodio de comienzo de síntomas en una institución sanitaria con adquisición relacionada con el sistema sanitario (HO-H-ICD) se define como un episodio de ICD con inicio de los síntomas más de 48 horas tras el ingreso en una institución sanitaria.
- Episodio de comienzo de síntomas en la comunidad con adquisición relacionada con el sistema sanitario (CO-H-ICD) se define como un episodio de ICD con inicio de los síntomas en la comunidad dentro de las 4 semanas posteriores desde el alta de una institución sanitaria.

ICD de adquisición en la comunidad (Community associated: C-ICD):

- Episodio de comienzo de síntomas en la comunidad con adquisición en la comunidad (CO-C-ICD) se define como un episodio de ICD con inicio de los síntomas en la comunidad o en menos de 48 horas tras el ingreso en una institución sanitaria, sin que hubiese sido dado de alta de cualquier institución sanitaria en las 12 semanas anteriores.

- Episodio de comienzo de síntomas en una institución sanitaria con adquisición en la comunidad (HO-C-ICD) se define como un episodio de ICD con inicio de los síntomas antes de las 48 horas siguientes a ser ingresado en una institución sanitaria sin que hubiese estado ingresado en las 12 semanas anteriores en una institución sanitaria.

Los pacientes con ICD adquirida en la comunidad, fueron además estratificados de acuerdo al nivel de exposición a la asistencia sanitaria como pacientes externos o como pacientes ingresados sin que llegasen a pernoctar en una institución sanitaria en las 12 semanas previas al episodio, como ha sido descrito por Chitnis y cols.[27]:

- sin exposición
- nivel bajo de exposición (consultas externas)
- alto nivel de exposición (cirugía ambulatoria, diálisis, urgencias, ingreso sin pernoctar o personal sanitario en contacto directo con pacientes)

ICD de adquisición indeterminada (Indeterminate CDI :I-CDI) se define como un episodio de ICD con inicio de los síntomas en la comunidad o antes de las 48 horas tras el ingreso en una institución sanitaria, habiendo sido dado de alta de una institución sanitaria en las 4 a 12 semanas anteriores al episodio.

La gravedad de la ICD ha sido definida de acuerdo a las guías de la Sociedad Americana de Epidemiología y Asistencia Sanitaria (Society of Healthcare Epidemiology of America: SHEA) y la Sociedad Americana de

Enfermedades Infecciosas (Infectious Diseases Society of America:IDSA) para las categorías leve a moderada y grave [1], para la categoría grave complicada la definición ha sido ligeramente modificada.

ICD Leve a Moderada se define como un episodio de ICD con un recuento de leucocitos de $\leq 15,000$ células/ μL y un nivel de creatinina sérica de menos de 1,5 veces el nivel basal.

ICD Grave se define como un episodio de ICD con un recuento de leucocitos de $> 15,000$ células/ μL y un nivel de creatinina sérica igual o mayor de 1,5 veces el nivel basal.

ICD Grave Complicada se define como un episodio de ICD que cursa con shock séptico o colectomía o megacolon o requiere ingreso en una unidad de cuidados intensivos dentro de los 7 días del diagnóstico del episodio o muerte atribuible a la ICD.

Recurrencia de la ICD(R-ICD) se define como retorno de los síntomas y muestra positiva para ICD entre los 15 y 60 días del episodio anterior tras recuperación del mismo. Los episodios que ocurren más allá del día 60 respecto al episodio anterior no se consideran recurrencias sino nuevos episodios y por ello sin relación con el anterior episodio.

Mortalidad asociada a la ICD se define como muerte no claramente atribuible a otras causas no relacionadas con la ICD, que ocurran en un periodo de 10 días tras el episodio de ICD y/o debido a complicaciones bien conocidas de la ICD.

4. Recogida de datos epidemiológicos y clínicos

El protocolo de recogida de datos clínicos y epidemiológicos se adjunta como Anexo 1. La información de los pacientes fue recogida a pie de cama, mediante la revisión de la historia clínica, a través de la red electrónica de historia o a través de entrevista telefónica con los pacientes. Toda la información se registró en el protocolo de recogida de datos clínicos y epidemiológicos que se adjunta como Anexo 1.

Los datos demográficos recogidos incluyen edad, sexo, unidad de hospitalización o de asistencia en el momento del diagnóstico, el historial de ingresos a instituciones sanitarias en los tres meses previos al episodio, esto último para determinar el origen de la infección.

Los datos referentes a la enfermedad de base se clasificaron de acuerdo a la escala de pronóstico descrita por McCabe y Jackson y los factores de comorbilidad se registraron de acuerdo con el índice de comorbilidad de Charlson. Se recogieron datos referentes a los factores de riesgo para la ICD presentes en el mes previo al episodio, que incluyeron el uso de antibióticos previo, uso de inhibidores de la bomba de protones, uso de sonda nasogástrica, ventilación mecánica y cirugía. Así mismo, se recogieron datos acerca de historial previo de ICD, quimioterapia, ingresos anteriores en unidades de aparato digestivo, diálisis, enfermedad inflamatoria intestinal y colonización previa por *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente.

En cuanto al episodio de ICD, se recogieron los siguientes datos clínicos: días de diarrea, presencia de dolor abdominal, distensión abdominal, fiebre, hipotensión, megacolon tóxico, colitis pseudomembranosa y nivel de

gravedad del episodio. La información acerca del tratamiento y evolución de los episodios de ICD también fueron registrados (necesidad de ingreso en una unidad de cuidados intensivos (UCI), cirugía debido al episodio, recurrencia de la ICD, mortalidad y mortalidad asociada a la ICD).

5. Detección de anticuerpos antitoxina

Se seleccionaron aquellos pacientes incluidos inicialmente en el estudio, que estuviesen en su primer episodio de ICD y que hubieran aceptado firmar el consentimiento informado. Se extrajo suero en el día +3 y +12 del episodio y se determinaron los niveles séricos de inmunoglobulina A y G frente a la toxina A y B de *C. difficile*.

La determinación se realizó mediante un ELISA (tgcBiomics, Alemania). La técnica ELISA es una técnica de inmunoensayo. En nuestro caso, si hay presencia de anticuerpos frente a las toxinas de *C. difficile*, estas se unirán a un antígeno inmovilizado (toxina) en el pocillo de la placa. El anticuerpo del paciente será reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado una enzima (conjugado) capaz de generar un producto detectable (color) tras la adición de un sustrato enzimático. La aparición de color permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el anticuerpo en la muestra (Figura 40).

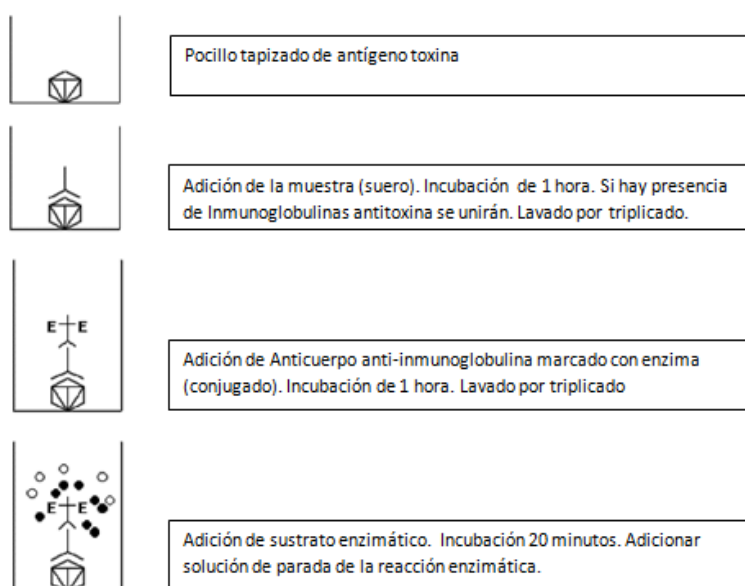


Fig. 40. Esquema del procedimiento de detección/cuantificación de anticuerpos

La técnica se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se pipeteó 100 µl de cada suero en un pocillo individual tapizado de toxina *C. difficile*, se dejó incubando durante 1 hora a 37°C. Pasado ese tiempo se realizó un lavado por triplicado con el líquido de lavado. A continuación se pipeteó 100µl de conjugado del anticuerpo correspondiente. Se dejó incubando durante 1 hora a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar un lavado por triplicado con el líquido de lavado. Tras el lavado, se añadió 100µl de sustrato en cada pocillo. A continuación, se dejó incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color. La reacción se detuvo mediante la adición de a cada pocillo. Pasado ese tiempo, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución de parada (H₂SO₄) a cada pocillo. La placa se sometió a lectura por medio de un espectrofotómetro a 450nm y a 620nm (Figura 41).

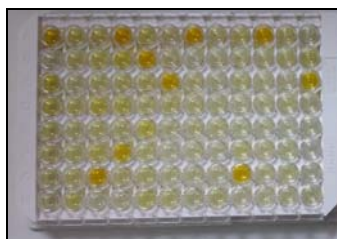


Fig. 41. Placa de ELISA para la detección de anticuerpos frente a *C. difficile*.

El procesamiento se realizó de manera automatizada a través del procesador automático Dynex DS2 (Alere, Reino Unido)(Figura 42).

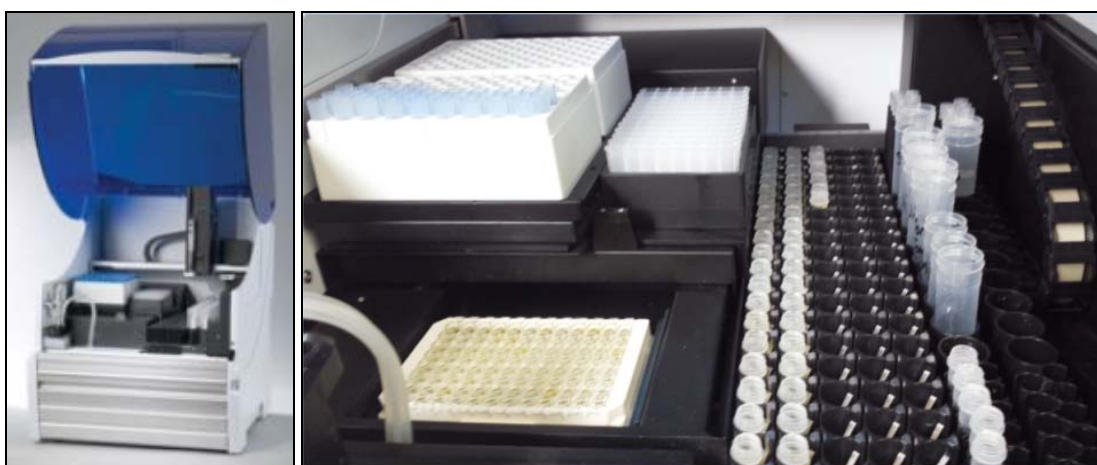


Fig. 42 Procesador automático Dynex DS2

La interpretación de los resultados se realizó basada en la densidad óptica (DO) a 450nm y 650nm, como el resultado de $DO_{450} - DO_{650}$. Como control de calidad en cada ensayo se determinaron en paralelo un control negativo y positivo, Se utilizó como control negativo el diluyente del kit y como control positivo, cada uno de las IgA e IgM de las toxinas A y B proporcionados en el Kit.

Para ser aceptada la determinación los valores de cada uno de los controles positivos debían ser $>1,00$ y el valor del control negativo debía ser $<1,00$.

6. Caracterización fenotípica de los aislados de *C. difficile*

Consiste en las siguientes determinaciones:

6.1.- Concentración de *Clostridium difficile* toxigénico (CDT) en la muestra.

Se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) de CDT en la muestra de heces sobre la que se realizó el diagnóstico de ICD de cada uno de los pacientes. Para ello, se homogenizaron 100 µl de muestra en 900µl de suero salino y, seguidamente se realizaron 3 diluciones 1:10 en suero salino. Una alícuota de 100µl de cada una de las 4 suspensiones resultantes (incluida la suspensión madre) se sembraron de forma cuantitativa en el medio ChromID *C. difficile* (BioMérieux, Francia) (Figura 43).

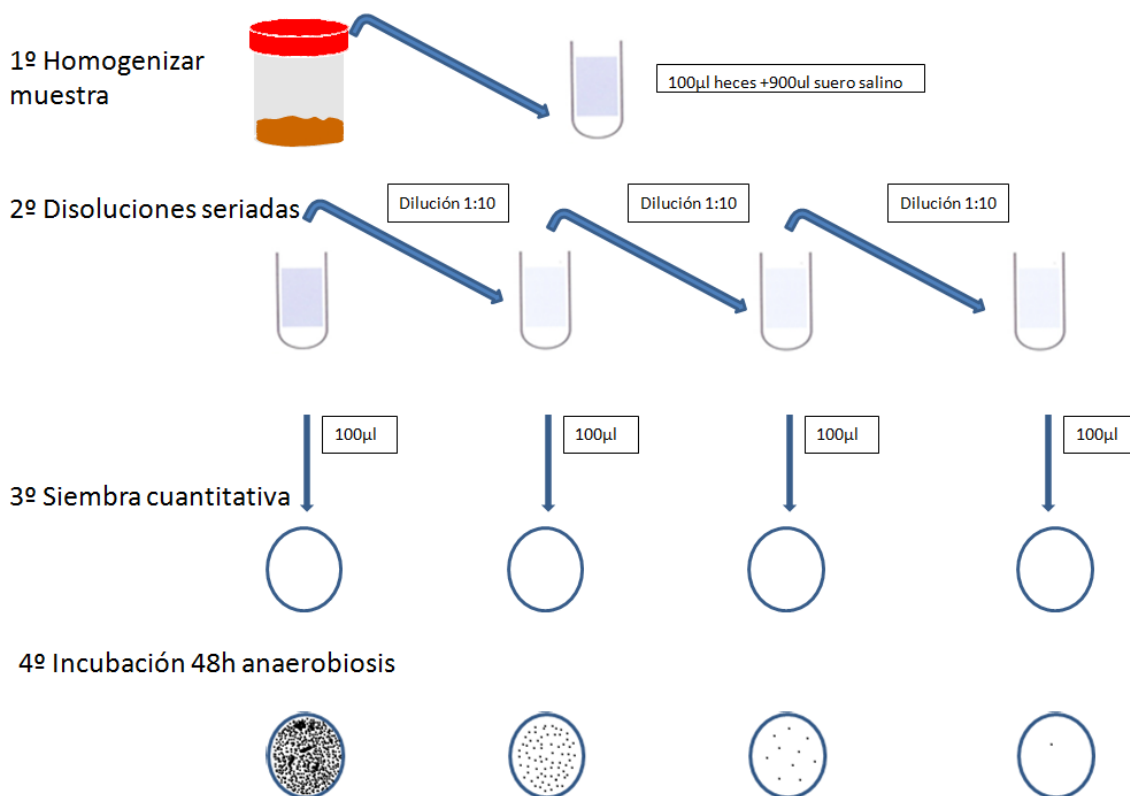


Fig. 43. Esquema del procedimiento para determinar la concentración *C. difficile* toxigénico en la muestra.

El medio ChromID *C. difficile* es un medio cromogénico cuya composición se encuentra bajo patente, en el que las colonias de *C. difficile* se identifican por su apariencia de colonias irregulares de color negro con apariencia típica de colonias de *C. difficile*.

Tras 48 horas de incubación en anaerobiosis a 35-7°C se seleccionó el cultivo de aquella suspensión en la que el recuento de CDT estuviera entre 10 y 1.000 ufc/placa y se realizó un recuento de cada morfotipo (Figura 44). El valor obtenido se multiplicó por su correspondiente factor de corrección para obtener el valor final de ufc/g muestra.

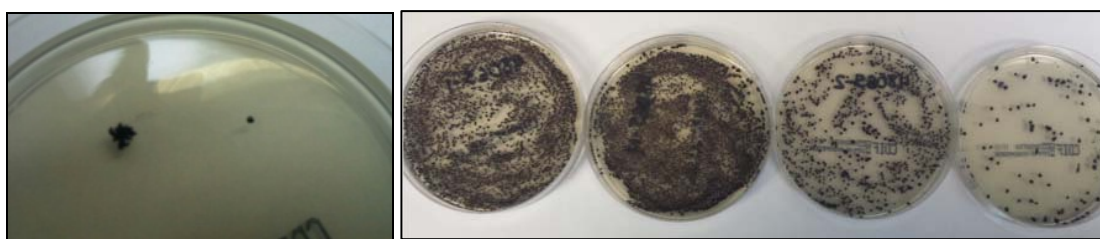


Fig. 44. (Izquierda) Dos colonias de *C. difficile* con distinto morfotipo en Agar ChromID; (Derecha) Colonias de *C. difficile* tras siembra cuantitativa de 4 diluciones seriadas 1:10.

6.2.- Concentración de toxinas.

Para determinar la cantidad de toxina A y B de cada una de las cepas de *C. difficile* por ufc se realizó un ELISA semiautomatizado (VIDAS *C. difficile* Toxin A/B test, BioMérieux, Francia) (Figura 45 y 46).

Primero, se realizó una suspensión de 4 McFarland a partir de colonias puras de los aislados de *C. difficile* obtenidos de la muestra del paciente sobre la que se realizó el diagnóstico de ICD. La suspensión 4 McFarland se midió mediante nefelómetro con un patrón 4 McFarland. A continuación, se añadió a 200µl de esta suspensión 500 µl de diluyente R1 en tubo de centrifuga que a continuación fue homogenizado mediante agitación. Una vez homogenizado,

se centrifugó durante cinco minutos a 12.000g y se transfirieron 300µl de sobrenadante al cartucho.

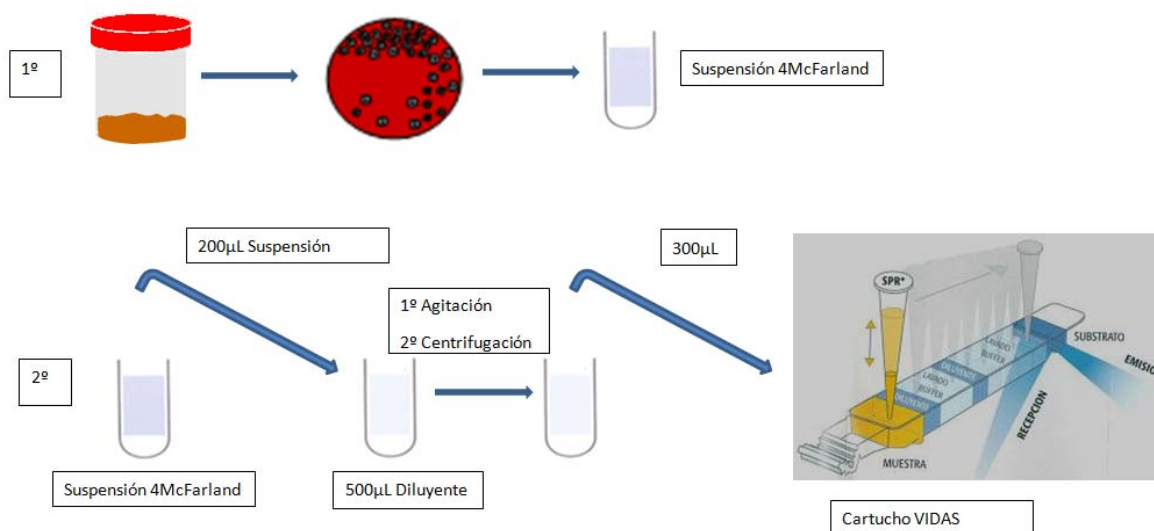


Fig. 45. Esquema del procedimiento para la cuantificación de toxina

Por cada determinación se incluyeron dos controles positivos y un control negativo del kit. Los controles se procesaron de la misma manera que la suspensión de *C. difficile*. Los resultados de las muestra solo fueron aceptados si los valores de los controles estaban dentro del rango esperado.

Los resultados de la cantidad de toxina de la cepa se determinaron en unidades de ELISA por ufc. Al conocer el número de ufc presentes por gramo de muestra, se pudo así calcular la cantidad de toxina por gramo de muestra.



Fig. 46. ELISA semiautomatizado (VIDAS *C. difficile* Toxin A/B test)

6.3.- Tasa de esporulación.

La tasa de esporulación se determinó mediante observación microscópica. Para ello, se partió de un subcultivo de 5 días del aislado de CDT crecido en agar Brucella a 35-7°C en anaerobiosis. A partir de varias colonias del subcultivo se realizó una suspensión en suero salino de aproximadamente 0,5 de McFarland. Se tomó una alícuota de 2µl y se observó en una cámara de recuento de Neubauer, con el objetivo 10X del microscopio se localizó la zona de recuento y para contar las células se cambió al objetivo 40X (Figuras 47 y 48).

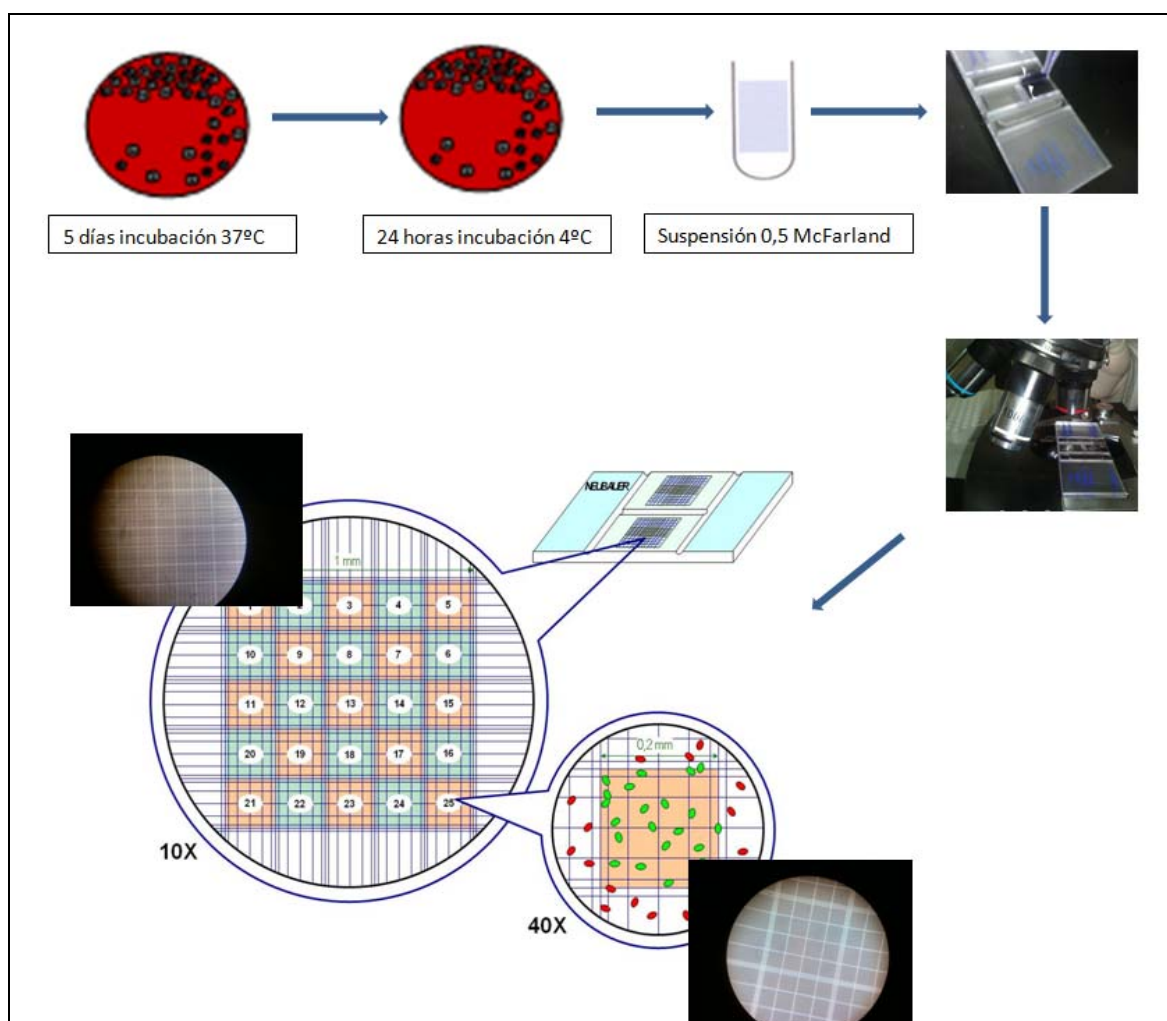


Fig. 47 Esquema del ensayo de esporulación y recuento en la cámara de neubauer

La tasa de esporulación se calculó como el número de esporas/50 campos observados dividido por el número total de células (esporas+células vegetativas)/50 campos observados X 100.

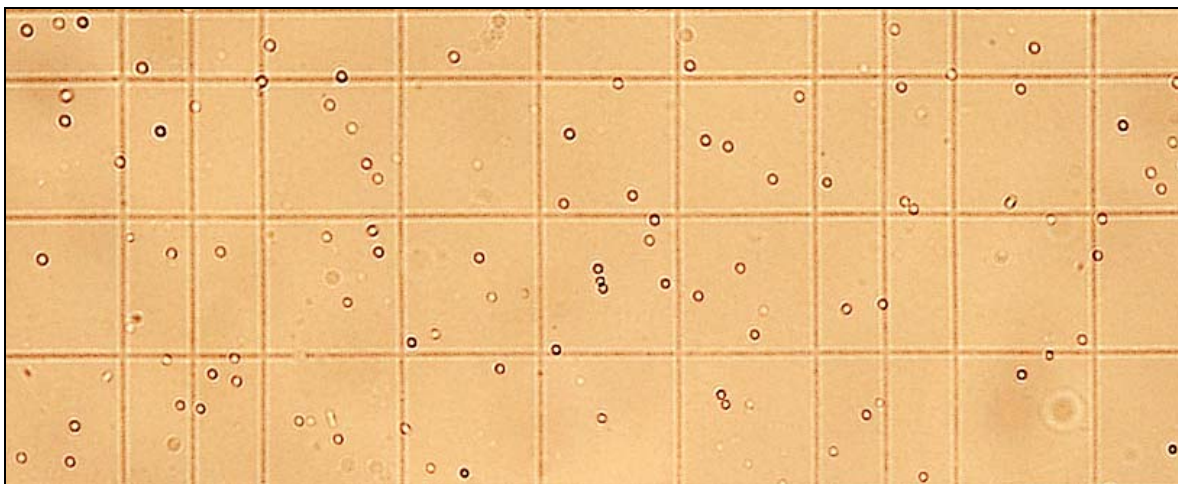


Fig. 48 Visión al microscopio de una celda de de la cámara de Neubauer, se observan esporas y células vegetativas.

6.4.- Tasa de germinación.

Para determinar la tasa de germinación de las cepas de CDT (Figura 49), se partió de un subcultivo de la cepa de CDT en agar Brucella incubada 48 horas en anaerobiosis a 37°C. A continuación se realizó una suspensión 0,5 de McFarland en suero salino. La suspensión se calentó a 80-90°C en un baño durante 10 minutos para matar a las formas vegetativas. Seguidamente se realizaron 3 diluciones 1:10 en suero salino.

Tras lo cual, se realizó un recuento del número de esporas en la cámara de Neubauer de las 4 suspensiones anteriores (suspensión madre y 3 diluciones). A continuación, Se inoculó 100µl de cada una de las 4 diluciones

en medio agar Brucella (bioMérieux, Francia). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en anaerobiosis.

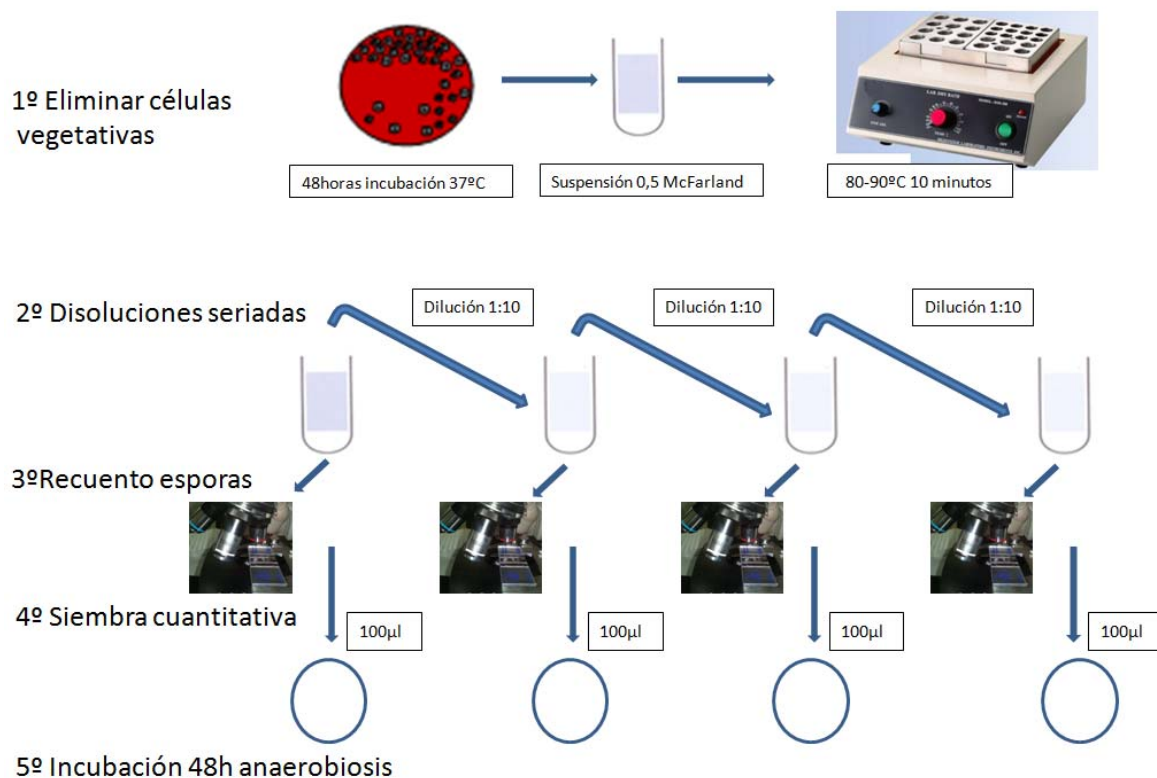


Fig. 49 Esquema del ensayo de germinación

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se procedió a realizar un recuento del número de colonias (Figura 50).

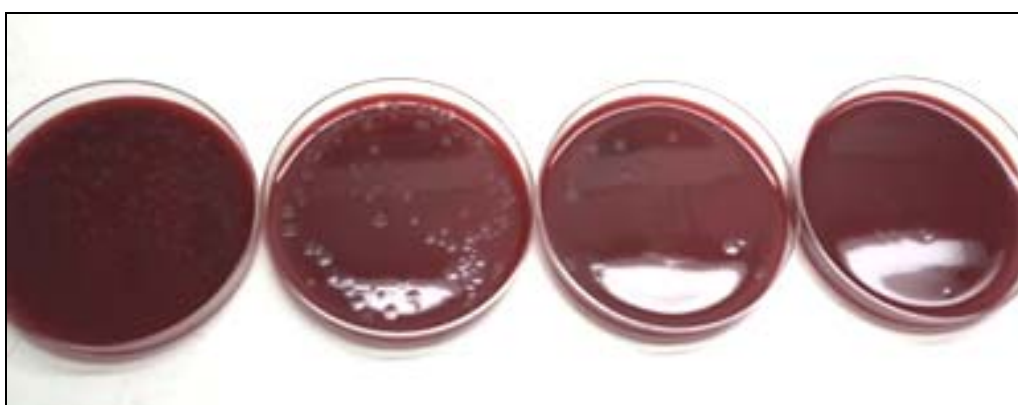


Fig. 50 Recuento de colonias del ensayo de germinación, cuatro diluciones seriadas 1:10 en agar Brucella

La tasa de germinación se calculó dividiendo el número de unidades formadoras de colonias/ml de suspensión por el recuento microscópico de esporas por mililitro de suspensión.

6.5.- Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos.

6.5.1 Determinación de sensibilidad de los aislados sin congelar de *C. difficile*.

Para poder observar si las cepas de *C. difficile* toxigénico procedentes de las muestras de los pacientes estudiados presentaban el fenómeno de heterorresistencia (subpoblaciones resistentes, dentro de la población bacteriana total de la cepa; Figura 51) se aplicó el método del Epsilon test y de la difusión en disco ,en cepas sin congelar, para la determinación de sensibilidad frente a metronidazol, ya que el fenómeno de heterorresistencia se pierde con la congelación y los subcultivos que se requieren para la determinación por el método de dilución en agar [467].



Fig. 51. Fenómeno de heterorresistencia de *C. difficile* frente a metronidazol.

Con el método E-test (AB Biodisk, Suecia) podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). Consiste en una

tira de plástico no poroso, de 6cm de largo por 5 mm de ancho, que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones.

Una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira (Figura 52).

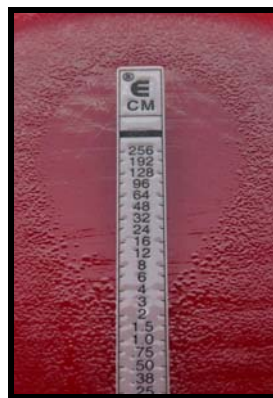


Fig. 52 Prueba de sensibilidad antibiótica de *C. difficile* mediante E-test.

La determinación de la sensibilidad por el método de disco (discos de 5µg Oxoid Basingstoke, Reino Unido) consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con el antibiótico. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurrido el tiempo de incubación los discos

aparecen rodeados por una zona de inhibición (Figura 53). La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS[22].



Fig. 53 Prueba de sensibilidad antibiótica de *C. difficile* mediante difusión en disco.

La determinación de la sensibilidad a metronidazol por E-test y disco se realizó a partir de cultivos sin congelar tras incubación de 48 horas en agar Brucella en ambiente de anaerobiosis a 37°C.

A continuación se realizó una suspensión de 0,5 McFarland y se inoculó mediante torunda toda la superficie de las placas de agar Brucella.

Para cada cepa se inocularon dos placas de agar Brucella, en una se colocó el E-test de metronidazol y en la otra el disco de metronidazol.

Tras incubación de 48 horas en ambiente de anaerobiosis a 37°C, se procedió a la lectura de las mismas.

6.5.2 Determinación de sensibilidad a antimicrobianos por el método de dilución en agar de aislados previamente congelados *C. difficile*.

Se determinarán las CMI de todos los aislados frente a 8 antibióticos: metronidazol, vancomicina, fidaxomicina, surotomicina, tigeciclina, rifaximina, moxifloxacino y clindamicina, mediante el método de dilución en agar, según las indicaciones de la NCCLS [22]. Los antibióticos surotomicina y fidaxomicina se obtuvieron de Cubist Pharmaceuticals (Lexington, MA , EEUU) y el resto de antibióticos se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St Louis, Missouri, EEUU).

Se realizaron diluciones madres de cada uno los antibióticos testados de concentración 10x a la concentración más alta a probar o un mínimo de al menos 1000µg/ml (la que fuese más elevada). Las fórmulas utilizadas para su cálculo fueron las siguientes:

$$\text{Volumen ml} = [(\text{peso actual mg}) \times (\text{Potencia } \mu\text{g/mg})] / \text{Concentración 10X } \mu\text{g/ml}$$
$$\text{Potencia} = (\text{Pureza}) \times (\text{Fraccion Activa}) \times (1 - \text{Contenido de agua Karl Fisher})$$

A partir de las soluciones madres, se prepararon diluciones seriadas de los distintos antibióticos hasta obtener las concentraciones necesarias para cada uno. Al mismo tiempo se preparó medio Brucella autoclavado, este medio

se dejó enfriar hasta una temperatura de 48-50°C y entonces se suplementó con un 5% de sangre de carnero lacada, vitamina K y hemina (Figuras 54 y 55). Además, para las placas destinadas a contener surotomicina, se suplementó el medio con una concentración de 50 g/L.



Fig. 54 Medio Brucella autoclavado mantenido a una temperatura de 48-50°C en baño.



Fig. 55 Medio Brucella autoclavado suplementado con sangre de carnero lacada.

En placas de Petri estériles se añadieron 2 ml y 18 ml de medio Brucella de cada dilución de antibiótico, dejándolas solidificar (Figura 56). Las placas se rotularon indicando el antimicrobiano que llevaban y su concentración. Además se prepararon placas control carentes de antibiótico con 18 ml de medio Brucella y 2ml agua estéril. Todas las

placas se guardaron a 4° C durante 24 horas para la correcta difusión del antibiótico.



Fig. 56 Preparación de las placas con 2ml de antibiótico, cada una de ellas a determinada concentración antes de la adición del medio *Brucella* suplementado.

Una vez transcurridas las 24 horas, se realizaron suspensiones de las cepas en tubos de BHI, hasta alcanzar un 0.5 de McFarland de turbidez (Figura 57). Se realizaron también suspensiones de 0.5 de McFarland de turbidez de microorganismos control: *C. difficile* ATCC 700057, *B. fragilis* ATCC 25285, *B. thetaiotamicron* ATCC 29741 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.



Fig. 57 Suspensiones de un 0.5 de McFarland de turbidez las cepas de *C. difficile* en tubos de BHI.

Los rangos de CMI de los microorganismos control para surotomicina fueron 0,125-1 µg/mL para *C. difficile* ATCC 700057 y 0,5-2

$\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* ATCC 29213. Los rangos de CMI de los microorganismos control para fidaxomicina fueron 0,06-0,25 $\mu\text{g/mL}$ para *C. difficile* ATCC 700057. Los rangos de CMI de los microorganismos control para el resto de antibióticos fueron los establecidos por NCCLS[22].

Para la dispensación de las muestras en las placas preparadas se utilizó un replicador automático (Replicador de Steers; Figura 58). Se replicaron las placas de menor a mayor concentración, añadiendo al principio y al final de cada serie dos placas control sin antibiótico.



Fig. 58 Replicador de Steers

Las placas replicadas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la completa absorción del inóculo, incubándose después durante 48 horas, a 37° C y en anaerobiosis. La mitad de las placas control se incubaron también en anaerobiosis y la otra mitad en atmósfera normal, para controlar posibles contaminaciones.

A las 48 horas se observó el crecimiento de cada muestra. La CMI se determinó como la menor concentración de antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento bacteriano, no se consideró crecimiento la

aparición de menos de 3 colonias aisladas o de un halo tenue debido al propio inóculo (Fig. 59).

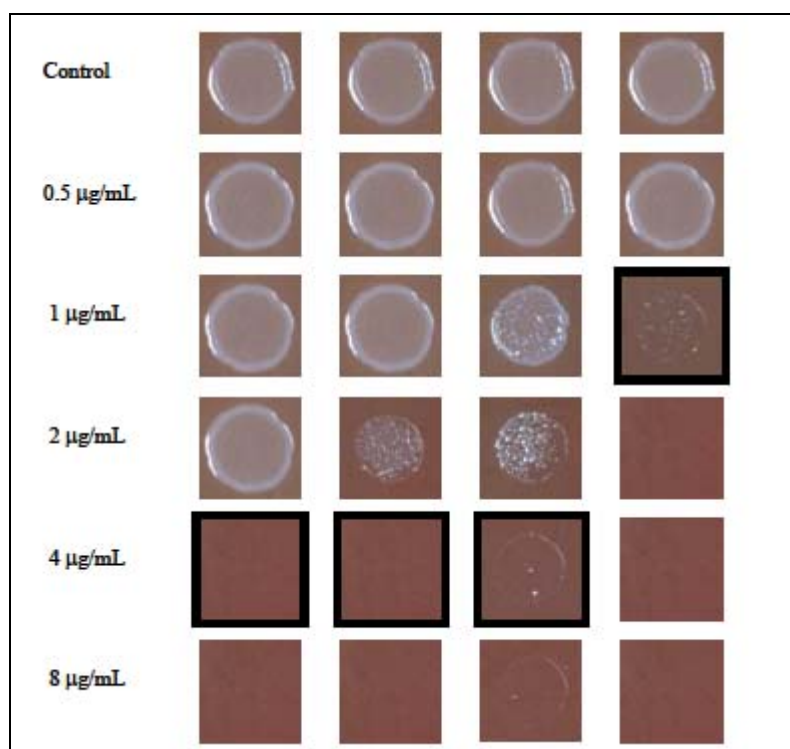


Fig. 59 Interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las pruebas de sensibilidad mediante dilución en agar. Los recuadros negros indican la concentración considerada como CMI.

En las placas de control anaerobias debió observarse crecimiento en todas las muestras, mientras que en las placas de control incubadas en atmósfera normal sólo debió crecer *S. aureus*.

Las concentraciones de antibiótico ensayadas fueron las siguientes: metronidazol (0,03-32µg/ml), vancomicina (0,03- 32µg/ml), surotomicina (0,06- 32 µg/ml), fidaxomicina (0,015-8 µg/ml), rifaximina 0,00094-256 µg/ml), moxifloxacino (0,06-32 µg/ml), clindamicina (0,06-256 µg/ml) y tigeciclina (0,03-

16 µg/ml). La concentración a partir de la cual un microorganismo se consideró resistente se estableció siguiendo las recomendaciones del NCCLS [22].

7. Caracterización genotípica de los aislados de *C. difficile*

7.1.- Extracción de ADN

La extracción de ADN de las cepas de CDT se realizó mediante la resina Chelex Instagene Matrix (Biorad) a partir de las cepas de *C. difficile* crecidas en agar Brucella e incubadas en condiciones de anaerobiosis. Se archivó una alícuota del ADN extraído a -70°C hasta su posterior utilización.

7.2.- Detección de los genes de las toxinas A (tcdA), B (tcdB) y binaria (cdtA y cdtB)

Se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex con control interno de amplificación según el método descrito por Persson y cols en 2008 [23].

7.3.- Ribotipado.

Es el método más extendido para el tipado molecular de *C. difficile*. Está basado en la detección de polimorfismos de un espaciador intergénico localizado entre los genes del ARN 16S y 23S por PCR y electroforesis en geles de agarosa de alta resolución de acuerdo con la técnica descrita por Stubbs y cols. en 1999 [25]. Los patrones electroforéticos resultantes, fueron analizados utilizando los coeficientes de Dice (relación entre los patrones electroforéticos basado en la presencia o ausencia de bandas) (BioNumerics

5.0 Kortrijk, Bélgica) Los elementos de la matriz fueron sometidos a análisis de agrupamiento empleando la técnica del algoritmo de emparejamiento de bandas con base en promedios aritméticos (UPGMA- unweighted pair-group metered using arithmetic average). Se realizó una comparación de los perfiles de nuestros aislados con librerías internacionales de perfiles de ribotipado. Los ribotipos fueron nombrados usando la designación internacional. Cuando la correspondencia con un ribotipo internacional fué desconocida se nombró usando la letra R seguido de número.

Una vez realizadas todas las técnicas moleculares, se consideró que los aislados pertenecían al mismo clon si presentaban el mismo perfil toxigénico y compartían perfil de ribotipado. Para el análisis de los casos recurrentes, si se aisló el mismo clon que el episodio anterior se consideró como recidiva y si fue distinto se consideró como reinfección.

8. Análisis de Datos

Conforme se obtuvieron los datos y resultados, éstos fueron introducidos en una base de datos de Access y finalmente se transferidos al paquete estadístico SPSS versión 19.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EEUU) para su análisis. Las variables cualitativas se expresaron con distribución de frecuencia. Las variables cuantitativas se expresaron como la mediana y rango intercuartílico (RIQ) para distribuciones que no siguen la normalidad; como media y desviación estándar en el caso de distribuciones normales. Los grupos se compararon utilizando la prueba exacta de Fisher para variables categóricas y para variables continuas se utilizó la prueba U-Mann-Whitney (distribuciones que no siguen la normalidad) o la prueba t (distribución normal).

Se realizaron distintos análisis multivariantes utilizando un modelo de regresión logística para determinar los factores de riesgo asociados al infradiagnóstico de la ICD, así como para evaluar la correlación de las distintas variables clínicas y microbiológicas con la mala evolución de los episodios de ICD. A multivariate logistic regression model was used to assess risk factors for clinical underdiagnosis. Para ello, se calcularon los odds ratio (OR) e intervalo de confianza (IC) del 95%. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como significativo.

Para desarrollar un sistema de puntuación o score de riesgo de mala evolución tanto clínico como clínico-microbiológico, las correspondientes variables asociadas como predictores de mala evolución fueron asignadas una puntuación proporcional a su coeficiente β . El Score para cada paciente se calculó sumando los puntos de todos los predictores presentes. El rendimiento de los modelos se evaluó utilizando la curva (ROC, receiver operating characteristic curve) y el área bajo la curva (AUC, area under the curve). Se calcularon los valores de validez: sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Los puntos de cortes de los scores se calcularon mediante la curva ROC, de manera tal que se maximizó la sensibilidad manteniendo un valor aceptable de especificidad. Los valores de validez se expresaron con un IC del 95% siguiendo una distribución binomial exacta. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como significativo.

RESULTADOS

1. Epidemiología y características clínicas de la infección por *C. difficile* aplicando un sistema de búsqueda sistemática.

El Hospital General Universitario Gregorio Marañón cuenta con 1550 camas, y atiende a una población aproximada de 715.000 habitantes del área sureste de la provincia de Madrid (Área Sanitaria 1 de Madrid).

Durante el periodo de inclusión del estudio, comprendido entre Enero y Junio del 2013, se recibieron un total de 4.098 muestras de heces no formes que fueron procesadas para la detección de *C. difficile* toxigénico (CDT), de las cuales, 3.673 muestras procedían de pacientes mayores de 2 años de edad, La incidencia media de la ICD por 10.000 estancias registrada en el hospital durante el periodo de estudio fue de 10,8 episodios/10.000 estancias.

Tras la exclusión de muestras duplicadas de un episodio índice, encontramos que 1.270 muestras (34,6% de todas las muestras) fueron enviadas sin petición de búsqueda de CDT.

Identificamos un total de 249 episodios de CDT, de los cuales 45 (18,1%) fueron excluidos por no cumplir criterios clínicos de infección por *C. difficile* (ICD). Por tanto, un total de 204 episodios de ICD fueron detectados, de los cuales, en 178 episodios hubo una

sospecha clínica de CDT y en 26 (12,7%) de los casos no hubo una sospecha y petición para la búsqueda de CDT.

La presencia de otros microorganismos fue detectada tan solo en un 5 casos (2,5% de los pacientes), siendo los microorganismos recuperados: *Campylobacter jejuni* (2 casos), *Salmonella* (2 casos), y rotavirus (1 caso).

1.1 Características demográficas y clínicas basales de los pacientes con de ICD (Tabla 2)

La mediana de edad de los pacientes fue de 69,6 años, y el 52,5% de los pacientes fueron varones. El 78,9% de los pacientes se encontraban hospitalizados en el momento del diagnóstico. El tipo de servicio de hospitalización de los pacientes fue mayoritariamente médico (70,8%), seguido de quirúrgico (15,5%), cuidados intensivos de adultos (5,5%), oncología (4,3%), pediatría (3,1%) y cuidados intensivos pediátricos (0,6%). Dentro de los servicios médicos destaca el servicio de medicina interna con un 43,9% seguido por aparato digestivo con un 18,4%, enfermedades infecciosas (7,9%), nefrología (7,9%), geriatría (5,3%), cardiología (5,3%) y otros (11,3%) del total de los pacientes ingresados en servicios médicos.

La mayor parte de los casos tenían una enfermedad de base con un pronóstico no fatal. La mediana del índice de comorbilidad de Charlson fue de 2,0. Las enfermedades de base fundamentales se detallan en la figura 60.

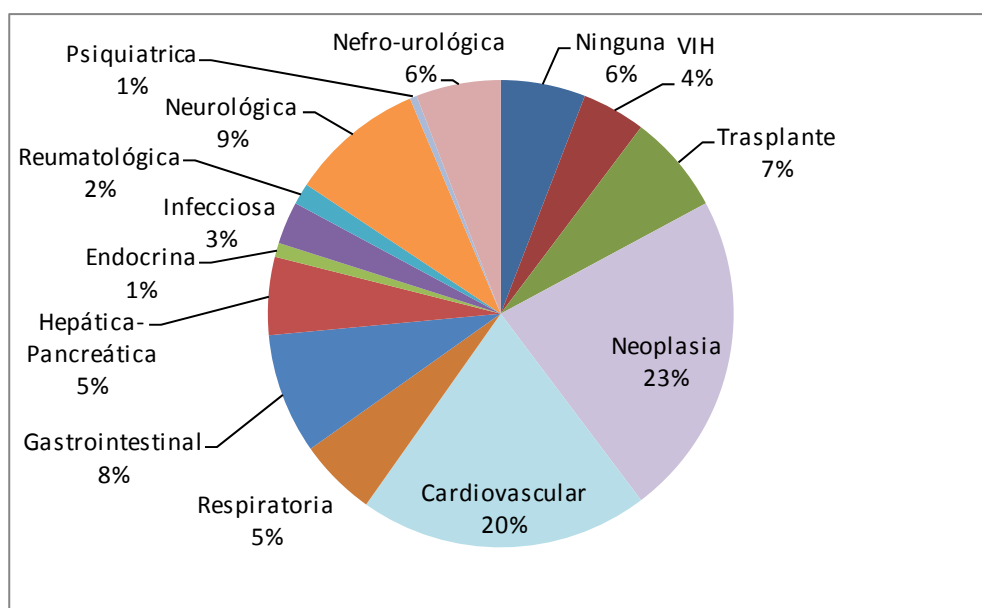


Fig. 60. Enfermedades de base fundamentales de los pacientes con ICD

Los factores de riesgo para la ICD más frecuentemente encontrados en los pacientes fueron haber recibido tratamiento antibiótico en el mes anterior al episodio (85,3%), con una mediana de número antibióticos recibidos de 2,0 y una mediana de 15 días de tratamiento, y haber recibido en el mes previo al episodio inhibidores de la bomba de protones (77,9%).

Otros factores de riesgo estuvieron presentes en menos del 21% de los pacientes, éstos fueron los siguientes: ingreso previo en una unidad de aparato digestivo (20,6%), cirugía en el mes anterior (17,6%), quimioterapia (13,7%), uso de sonda nasogástrica (12,7%), ventilación mecánica (12,3%), diálisis (9,3%), enfermedad inflamatoria intestinal (9,3%) y aislamiento previo de *S. aureus* meticilin-resistente(4,4%).

Tabla 2. Características Demográficas y Clínicas

Características Demográficas y Clínicas	Pacientes con ICD n=204
Datos Demográficos	
Varón	107 (52,5%)
Edad, años, mediana (RIQ)	69,6 (50,1 -81,6)
Pediátricos	16 (7,8%)
Clasificación McCabe y Jackson	
No fatal	185 (90,7%)
Últimamente mortal	18 (8,8%)
Rápidamente mortal	1 (0,5%)
Enfermedad de Base	
Ninguna	12 (5,9%)
Trasplantado	14 (6,9%)
Cardiovascular	41 (20,1%)
Neoplasia	46 (22,5%)
Neurológica	19 (9,3%)
Gastrointestinal	17 (8,3%)
Nefrourológica	12 (5,9%)
Índice de Comorbilidad de Charlson, mediana (RIQ)	2,0 (0,0-4,0)
Factores de Riesgo	
Antibiótico Previo	174 (85,3%)
Inhibidores de la bomba de protones	159 (77,9%)
Sonda nasogástrica	26 (12,7%)
Enfermedad Inflamatoria Intestinal	19 (9,3%)
Cirugía	36 (17,6%)
Ventilación Mecánica	25 (12,3%)
SARM	9 (4,4%)
Quimioterapia	28 (13,7%)
Ingreso anterior en unidad de aparato digestivo	42 (20,6%)
Diálisis	19 (9,3%)

1.2 Características del episodio de ICD (Tabla 3)

La mayoría de los episodios de ICD (83,8%) en el momento del diagnóstico fueron clasificados como ICD leves o moderados, un 14,7% graves y tan solo 1.5% fueron considerados como graves-complicados.

La mayoría de los pacientes (84,3%) recibieron tratamiento antibiótico para el episodio. De los pacientes que fueron tratados un 85,5% fueron tratados con metronidazol únicamente, el 2,9% con vancomicina únicamente, el 7% fueron tratados inicialmente con metronidazol y posteriormente con vancomicina, el 3,5% de los pacientes fueron tratados simultáneamente con metronidazol y vancomicina, el 0,6% fueron tratados inicialmente con vancomicina y posteriormente fueron cambiados a metronidazol y el 0,6% fueron tratados con fidaxomicina. Ninguno de los pacientes requirió cirugía por la ICD.

1.3 Evolución del episodio de ICD (Tabla 3)

De los 204 episodios de ICD, 33 (16,2%) recurrieron, de los cuales 23 pacientes (69,7%) tuvieron una única recurrencia, 7 pacientes (21,2%) tuvieron dos episodios de recurrencia, 2 pacientes (6,1%) tuvieron 3 recurrencias y 1 paciente (3%) tuvo 4 recurrencias. Solo el 1,5% del total de pacientes requirió ingreso en una unidad de cuidados intensivos en relación con la ICD. La mortalidad global fue de un 8,3% y la mortalidad atribuible a la ICD fue de un 2,5%.

Tabla 3. Características y evolución del episodio de ICD

Características y evolución del episodio de ICD	Pacientes con ICD n=204
Episodio ICD	
Leve-moderado	171 (83,8%)
Grave-Grave complicado	33 (16,2%)
Dolor*	86 (42,6%)
Diarrea, días, mediana (IQR)	3,0 (2,0-5,0)
Sospecha clínica de ICD	178 (87,3%)
Otros microorganismos	5 (2,5%)
Recibió tratamiento ICD	172 (84,3%)
Evolución	
Mortalidad global	17 (8,3%)
Mortalidad relacionada con ICD	5 (2,5%)

1.4 Episodios de ICD recurrentes (R-ICD): características clínicas y comparación entre los episodios R-ICD y los episodio de ICD no recurrentes (No-R-ICD) (Tabla 4)

La mayoría de los pacientes con R-ICD fueron mujeres (54,5%), con una mediana de edad de 72,8 años. Tan solo el 3,0% de los pacientes con R-ICD eran menores de 17 años.

La enfermedad de base que más frecuentemente presentaron estos pacientes fue la neoplasia (36,4%, seguida de enfermedad cardiovascular (18,2%). La mediana del índice de comorbilidad de Charlson fue de 3,0.

En cuanto a los factores de riesgo para la ICD presentes, destacan el haber recibido tratamiento antibiótico previo e inhibidores de la bomba de protones (90,9% y 81,8%, respectivamente).

Respecto al cuadro clínico de la ICD, cursó de manera leve a moderada en la mayoría de los pacientes (81,8%) con una mediana de 4 días de diarrea y la presencia de dolor abdominal en aproximadamente la mitad de los pacientes (46,9%). Ninguno de ellos desarrolló megacolon tóxico y en dos pacientes se observaron imágenes compatibles con colitis pseudomembranosa (Figura 61). La mortalidad global de este grupo de pacientes se situó en un 9,1% y la mortalidad asociada a la ICD fue de un 3,0%.

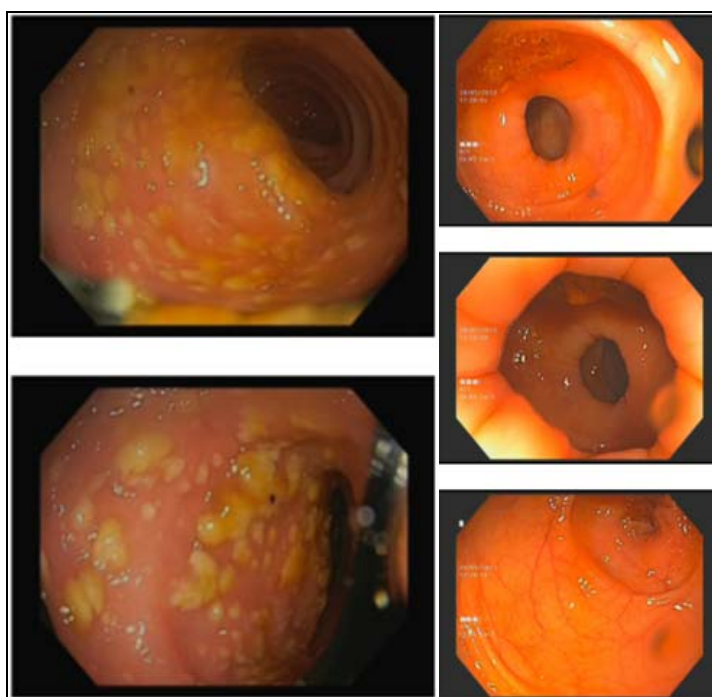


Fig. 61. Imágenes de colitis pseudomembranosa (Izquierda) y resolución de la misma tras el tratamiento antibiótico (Derecha).

La comparación entre los casos de R-ICD y No-R-ICD no reveló ninguna diferencia en cuanto a las características demográficas, enfermedades de base, comorbilidades y factores de riesgo.

Tabla 4. Comparación entre pacientes con ICD recurrente y no recurrente.

Características Demográficas y Clínicas	R-CDI n=33	Non-R-CDI n=171	p (R-CDI vs Non-R-CDI)
Datos Demográficos			
Varón	15 (45,5%)	92 (53,8%)	p=0,448
Edad, años, mediana (RIQ)	72,8 (59,4-81,4)	67,4 (49,4 -81,6)	p=0,277
Pediátricos	1 (3,0%)	15 (8,8%)	p=0,478
Clasificación McCabe y Jackson			
No fatal	28 (84,8%)	157 (91,8%)	p=0,202
Últimamente mortal	4 (12,1%)	14 (8,2%)	p=0,501
Rápidamente mortal	1 (3,0%)	0 (0%)	p=0,162
Enfermedad de Base			
Ninguna	1 (3,0%)	11 (6,4%)	p=0,695
Trasplantado	1 (3,0%)	13 (7,6%)	p=0,476
Cardiovascular	6 (18,2%)	35 (20,5%)	p=1,000
Neoplasia	12 (36,4%)	34 (19,9%)	p=0,066
Neurológica	3 (9,1%)	16 (9,4%)	p=1,000
Gastrointestinal	3 (9,1%)	14 (8,2%)	p=0,742
Nefrourológica	3 (9,1%)	9 (5,3%)	p=0,416
Índice de Comorbilidad de Charlson, mediana (RIQ)	3,0 (0,5-5,5)	2,0 (0,0-4,0)	p=0,162
Factores de Riesgo			
Antibiótico Previo	30 (90,9%)	144 (84,2%)	p=0,426
Inhibidores de la bomba de protones	27 (81,8%)	132 (77,2%)	p=0,652
Sonda nasogástrica	6 (18,2%)	20 (11,7%)	p=0,389
Enfermedad Inflamatoria Intestinal	4 (12,1%)	15 (8,8%)	p=0,519
Cirugía	4 (12,1%)	32 (18,7%)	p=0,460
Ventilación Mecánica	2 (6,1%)	23 (13,5%)	p=0,383
SARM	2 (6,1%)	7 (4,1%)	p=0,641
Quimioterapia	7 (21,2%)	21 (12,3%)	p=0,175
Ingreso anterior en unidad de aparato digestivo	10 (30,3%)	32 (18,7%)	p=0,158
Diálisis	4 (12,1%)	15 (8,8%)	p=0,519

No se encontró ningún marcador temprano de R-ICD. En cuanto a la gravedad del episodio, parámetros analíticos en el momento del diagnóstico, mortalidad global y mortalidad asociada a la ICD tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5).

Las únicas diferencias estadísticamente significativas que se observaron fueron que los pacientes con R-ICD tuvieron un mayor número de días de estancia tras el episodio inicial ($p<0.001$), una estancia global más larga ($p=0.025$), así como un tratamiento más largo para la ICD inicial ($p=0.035$).

Tabla 5. Comparación del cuadro clínico y evolución de la R-ICD y no R-ICD.

Características y evolución del episodio de ICD	R-CDI n=33	Non-R-CDI n=171	p (R-CDI vs Non-R-CDI)
Episodio ICD			
Leve-moderado	27 (81.8%)	144 (84.2%)	$p=0.796$
Grave-Grave complicado	6 (18.2%)	27 (15.8%)	$p=0.796$
Dolor	15 (46.9%)	71 (41.8%)	$p=0.697$
Diarrea, días, mediana (IQR)	4.0 (2.0-6.8)	3.0 (2.0-5.0)	$p=0.154$
Sospecha clínica de ICD	30 (90.9%)	148 (86.5%)	$p=0.775$
Otros microorganismos	2 (6.1%)	3 (1.8%)	$p=0.185$
Recibió tratamiento ICD	32 (97.0%)	140 (81.9%)	$p=0.034$
Evolución			
Mortalidad global	3 (9.1%)	14 (8.2%)	$p=0.742$
Mortalidad relacionada con ICD	1 (3.0%)	4 (2.3%)	$p=0.590$

1.5 Episodios de ICD no sospechados por el clínico (No-S-ICD) y comparación con los episodios de ICD con sospecha clínica (S-ICD)

(Tabla 6)

Veintiséis casos de ICD (12,7% de todos los episodios) no hubieran sido diagnosticados de no haberse implementado el sistema de búsqueda sistemática de CDT.

Los pacientes que no generaron una sospecha de ICD en el clínico presentaron una mediana de edad de 29,0 años, el 42,3% de los pacientes cuyo diagnóstico hubiera pasado desapercibido fueron pacientes pediátricos.

Destaca que el 26,9% de los pacientes no presentaban ninguna enfermedad de base y prácticamente la totalidad de los pacientes que tenían una enfermedad de base, esta era de tipo no fatal. El tipo de enfermedad de base más prevalente en este subgrupo fue la enfermedad gastrointestinal (23,1%). La mediana del índice de comorbilidad de Charlson para estos pacientes fue de 0,0.

En cuanto a los factores de riesgo para la ICD, el uso de antibióticos en el mes anterior fue de un 61,5%, el consumo previo de inhibidores de la bomba de protones fue de un 30,8% y había enfermedad inflamatoria intestinal en un 19,2%, encontrándose el resto de factores de riesgo estudiados por debajo del 12%.

La adquisición de la ICD en los pacientes que no levantaron una sospecha clínica fue mayoritariamente comunitaria (65,4%). Dentro de estos pacientes la ICD cursó de manera leve a moderada en todos los enfermos salvo en uno de ellos (3,8%). Este caso tuvo un desenlace fatal, siendo la ICD la causa más probable de la muerte del paciente. Se trataba de un paciente de 89 años de edad, independiente para las actividades de la vida diaria, que

ingresa por isquemia crónica IV en miembro inferior izquierdo, reagudizada. En el día que estaba prevista su alta comienza con deposiciones diarreicas y distensión abdominal, se produce un empeoramiento evidente y las 24 horas fallece con diarrea activa. El paciente presentaba como factor de riesgo para la ICD haber recibido un ciclo antibiótico con quinolonas durante su ingreso.

La comparación entre los casos con sospecha clínica y los que no fueron sospechados por parte del clínico, reveló que estos últimos fueron significativamente más jóvenes (mediana de edad 29,0 vs 72,2 años; $p<0.001$). Además, presentaron menos frecuentemente enfermedades de base (26,9% ninguna enfermedad de base vs un 2,8%; $p<0,001$), la neoplasia fue significativamente menos frecuente (3,8%vs 25,3%; $p=0,012$) y la enfermedad gastrointestinal fue mucho más frecuente (23,1% vs 6,2%; $p=0,011$) en estos pacientes. El índice de comorbilidad de Charlson fue significativamente más bajo (0,0 vs 3,0; $p<0,001$) en estos enfermos.

Los episodios no-S-ICD fueron más frecuentemente de adquisición comunitaria (65,4%vs 11,8%; $p<0,001$), habían recibido en menor medida antibióticos (61,5% vs 88,8%; $p=0,001$) y menos inhibidores de la bomba de protones (30,8% vs 84,8%; $p <0,001$), y habían estado menos frecuentemente bajo ventilación mecánica (0,0% vs 14,0%; $p=0,049$) en el mes previo al episodio, comparados con los S-ICD.

Tabla 6. Comparación entre los casos de Sospecha y No Sospecha de ICD

Características	S-ICD n=178	No-S-ICD n=26	p
Datos Demográficos			
Varón	92 (51,7%)	15 (57,7%)	0,675
Edad, años, mediana (RIQ)	72,2 (55,1-81,9)	29,0 (5,2-72,1)	<0,001
Pediátrico	5 (2,8%)	11 (42,3%)	<0,001
Clasificación McCabe y Jackson			
No fatal	160 (89,9%)	25 (96,2%)	0,478
Últimamente mortal	17 (9,6%)	1 (3,8%)	0,479
Rápidamente mortal	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1,000
Enfermedad de Base			
Ninguna	5 (2,8%)	7 (26,9%)	<0,001
Trasplantado	12 (6,7%)	2 (7,7%)	0,695
Cardiovascular	39 (21,9%)	2 (7,7%)	0,117
Neoplasia	45 (25,3%)	1 (3,8%)	0,012
Neurológica	18 (10,1%)	1 (3,8%)	0,478
Gastrointestinal	11 (6,2%)	6 (23,1%)	0,011
Índice de Charlson	3,0 (1,0-5,0)	0,0 (0,0-0,0)	<0,001
Factores de riesgo			
Antibióticos	158 (88,8%)	16 (61,5%)	0,001
Inhibidores de la bomba de protones	151 (84,8%)	8 (30,8%)	<0,001
Sonde nasogástrica	25 (14,0%)	1 (3,8%)	0,211
Enfermedad inflamatoria intestinal	14 (7,9%)	5 (19,2%)	0,074
Cirugía	35 (19,7%)	1 (3,8%)	0,054
Ventilación mecánica	25 (14,0%)	0 (0,0%)	0,049
SAMR	9 (5,1%)	0 (0,0%)	0,607
Quimioterapia	27 (15,2%)	1 (3,8%)	0,217
Ingreso previo en A. Digestivo	39 (21,9%)	3 (11,5%)	0,302
Diálisis	17 (9,6%)	2 (7,7%)	1,000

En cuanto al episodio de ICD los casos no sospechados presentaron más frecuentemente dolor abdominal como síntoma (60,0% vs 40,1%; $p=0,083$). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a duración de la diarrea ni a gravedad de la misma entre los dos grupos. De manera similar, no se objetivaron diferencias en cuanto a tasa de infección recurrente, mala evolución, mortalidad global y mortalidad asociada al episodio (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de la ICD y su evolución entre los casos de Sospecha y No Sospecha de ICD

Características de la ICD	S-ICD n=178	No-S-ICD n=26	p
Episodio ICD			
H-ICD	147 (82,6%)	5 (19,2%)	<0,001
C-ICD	21 (11,8%)	17 (65,4%)	<0,001
I-ICD	10 (5,6%)	4 (15,4%)	0,085
Leve-moderado	146 (82,0%)	25 (96,2%)	0,086
Grave-grave complicado	32 (18,0%)	1 (3,8%)	0,086
Dolor	71 (40,1%)	15 (60,0%)	0,083
Días de diarrea	3,0 (2,0-5,0)	3,0 (2,0-8,0)	0,320
Tratamiento ICD	164 (92,1%)	8 (30,8%)	<0,001
Evolución			
Recurrencia	30 (16,9%)	3 (11,5%)	0,775
Mortalidad global	16 (9,0%)	1 (3,8%)	0,703
Mortalidad relacionada con ICD	4 (2,2%)	1 (3,8%)	0,498

Realizamos un análisis multivariable para investigar qué factores clínicos y epidemiológicos se asociaban de manera independiente a la falta de sospecha clínica, las variables incluidas fueron las siguientes: edad, índice de

comorbilidad de Charlson, el uso de antibiótico previo, uso de inhibidores de la bomba de protones, uso de ventilación mecánica, neoplasia, enfermedad gastrointestinal y adquisición comunitaria de la ICD.

Encontramos que el tener un origen comunitario de la infección ($p < 0,001$; OR= 10,892; 95% CI 3,872-30,642) se asociaba con tener casi 11 veces más probabilidades de que la ICD no fuera sospechada por el clínico, la edad también se asoció de manera independiente con la falta de sospecha clínica de la ICD ($p < 0,001$; OR=0,958; 95% CI 0,939-0,977), es decir a menor edad más riesgo de que la ICD no fuera sospechada.

2. Presentación, gravedad y evolución de la ICD de origen comunitario y de adquisición relacionada con la asistencia sanitaria

2.1 Incidencia de los distintos tipos de ICD en función del potencial lugar de adquisición de acuerdo a las guías internacionales.

Durante el periodo de estudio, de los 204 episodios iniciales que detectamos, el 74,5% (152 episodios) correspondieron a casos de adquisición relacionada con el sistema sanitario (H-ICD), el 18,6% (38 episodios) fueron de adquisición en la comunidad (C-ICD) y el 6,9% (14 episodios) tuvo un origen indeterminado (I-ICD). La figura 62 muestra un diagrama detallado del tipo de casos.

Estos datos corresponden con una incidencia de 8,0 episodios de H-ICD por 10.000 pacientes día y a 23,9 episodios de C-ICD por 100.000 habitantes.

De los casos de adquisición relacionada con la asistencia sanitaria, el 85,5% de estos casos tuvo un comienzo de los síntomas en el ámbito hospitalario y tan solo un 14,5% tuvo un comienzo de los síntomas en la comunidad.

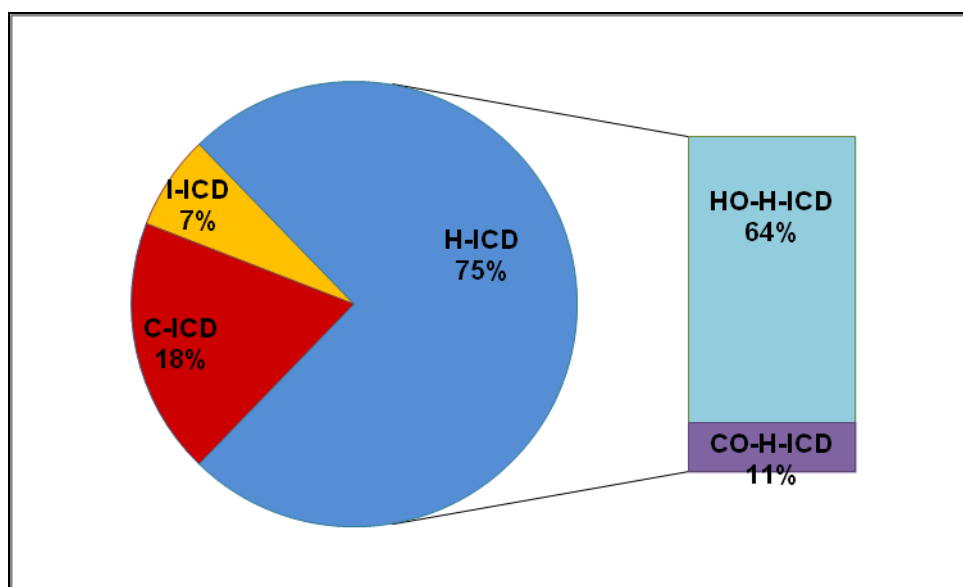


Fig. 62. Episodios de ICD en función de su lugar de adquisición (Comunitario C-ICD; H-ICD Hospitalario; Indeterminado i-ICD) y dentro de los H-ICD en función del lugar de comienzo de los síntomas (Comienzo comunitario; CO-H-ICD, hospitalario; HO-H-ICD)

2.2 ICD de adquisición relacionada con la asistencia sanitaria

La mayoría de los pacientes con H-ICD fueron varones (53,9%), con una mediana de edad de 72,7 años. Tan solo el 4,6% de los pacientes con H-ICD eran pacientes pediátricos.

La enfermedad de base que más frecuentemente presentaron estos pacientes fue la neoplasia (25,7%, seguida de enfermedad cardiovascular (23,0%). La mediana del índice de comorbilidad de Charlson fue de 3,0.

En cuanto a los factores de riesgo para la ICD presentes, destacan el haber recibido tratamiento antibiótico previo e inhibidores de la bomba de protones con un 92,8% y 91,4%, respectivamente. En este tipo de pacientes la sospecha clínica de ICD fue muy elevada (96,7%)

Respecto al cuadro clínico de la ICD, el 18,4% cursó de manera grave a grave complicada. La tasa de recurrencia de este grupo de pacientes fue de un 17,1% La mortalidad global de este grupo de pacientes se situó en un 11,2% y la mortalidad asociada a la ICD fue de un 3,3%.

2.3 ICD de adquisición en la comunidad

Los pacientes con C-ICD eran en su mayoría mujeres (67,9%), con una mediana de edad de 57,4 años, destaca el importante porcentaje (18,4%) de pacientes pediátricos.

Así mismo, destacó el porcentaje de pacientes que no presentaban ninguna enfermedad de base (21,1%) y la mediana del índice de comorbilidad de Charlson que fue de 0,0. La enfermedad de base más frecuente en los pacientes con que sí presentaba alguna enfermedad de base fue la enfermedad gastrointestinal.

En cuanto a los factores de riesgo clásicos para la ICD, el porcentaje de pacientes que habían recibido tratamiento antibiótico previo fue del 65,8%, seguido de tratamiento con inhibidores de la bomba de protones en tan solo el 28,9% de los pacientes. El 31,6% de los pacientes se encontraban ingresados en el momento del diagnóstico. Ninguno de los pacientes de este subgrupo había tenido una intervención quirúrgica ni habían requerido ventilación

mecánica en el mes previo o durante los días de ingreso previos al episodio. El índice de sospecha clínica en estos pacientes fue tan solo del 55,3%.

La enfermedad curso en la gran mayoría de manera leve a moderada (92,1%), aunque la mediana de días de duración de diarrea fue de 5 días y el 64,9% presentó dolor abdominal y un 18,4% distensión abdominal. Ninguno de los pacientes requirió ingreso en una unidad de cuidados intensivos debido al episodio de ICD. Ninguno de los pacientes de este subgrupo falleció por la ICD o por otras causas no asociadas a la ICD. La tasa de recurrencia de la ICD fue de un 10,5%.

2.4 ICD de adquisición indeterminada

Un porcentaje de los episodios (6,9%) se clasificó como de origen indeterminado ya que habían presentado un ingreso previo durante las 8 a 12 semanas anteriores al episodio.

La mediana de edad de estos pacientes fue de 66,5 años, siendo la mayoría varones (64,3%). La enfermedad de base más frecuente de estos pacientes fue la neoplasia, aunque ninguno de los pacientes presentó un pronóstico fatal de su enfermedad de base. Destaca un índice de comorbilidad de Charlson de 3,5.

En cuanto a la presencia de factores de riesgo para la ICD, llama la atención que el 42,9% de estos enfermos había tenido algún ingreso previo en una unidad de aparato digestivo. El índice de sospecha clínica de ICD en esta población fue de un 71,4%. La enfermedad se presentó de forma grave a grave complicada en un 14,3% de los pacientes. La tasa de recurrencia fue de un 21,4% y no hubo ningún caso mortal.

2.5 Comparación de los distintos tipos de ICD según el lugar de adquisición (Tabla 8)

Se observaron algunas diferencias estadísticamente significativas al comparar la ICD de origen comunitario y la relacionada con la asistencia sanitaria.

Los pacientes con C-CDI eran más jóvenes ($p=0,002$) y presentaron menos frecuentemente enfermedades de base ($p<0,001$). Además los pacientes con C-ICD presentaron de manera menos frecuente neoplasia ($p=0,017$) y enfermedad cardiovascular ($p=0,041$). El índice de comorbilidad de Charlson fue mucho menor en los pacientes con C-ICD ($p<0,001$).

En relación con los factores de riesgo clásicos, los pacientes con C-ICD recibieron menos frecuentemente tratamiento antibiótico previo ($p<0,001$), inhibidores de la bomba de protones ($p<0,001$), sonda nasogástrica ($p=0,032$), cirugía ($p<0,001$), y ventilación mecánica ($p=0,005$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la C-ICD y la H-ICD en cuanto a gravedad del episodio, aunque en la C-ICD el dolor abdominal fue más frecuente en estos pacientes ($p=0,005$), así mismo presentaron un mayor número de días de diarrea ($p<0,001$).

Tampoco de encontraron diferencias significativas en cuanto a número de recurrencias. Todos los casos mortales se presentaron en el grupo de H-ICD, se observó una diferencia estadísticamente significativa para la mortalidad global, pero en cuanto a mortalidad relacionada con el episodio la esta diferencia estadísticamente significativa no se pudo demostrar.

Tabla 8. Comparación de los distintos ICD según el lugar de adquisición

Características	H-CDI n=152	C-CDI n=38	I-CDI n=14	p HvsC	p HvsI	p CvsI
Datos demográficos						
Varón	82 (53,9%)	16 (42,1%)	9 (64,3%)	0,208	0,579	0,215
Edad, años, mediana (RIQ)	72,7 (55,2-82,4)	57,4 (23,1-79,2)	66,5 (31,3-81,2)	0,002	0,155	0,585
Pedriático	7 (4,6%)	7 (18,4%)	2 (14,3%)	0,009	0,169	1,000
Enfermedad de Base						
Ninguna	3 (2,0%)	8 (21,1%)	1 (7,1%)	<0,001	0,299	0,415
Trasplantado	11 (7,2%)	2 (5,3%)	1 (7,1%)	1,000	1,000	1,000
Cardiovascular	35 (23,0%)	3 (7,9%)	3 (21,4%)	0,041	1,000	0,325
Neoplasia	39 (25,7%)	3 (7,9%)	4 (28,6%)	0,017	0,759	0,075
Neurológica	13 (8,6%)	6 (15,8%)	0 (0,0%)	0,224	0,605	0,174
Gastrointestinal	7 (4,6%)	7 (18,4%)	3 (21,4%)	0,009	0,041	1,000
Índice Charlson, mediana (RIQ)	3,0 (1,0-4,0)	0,0 (0,0-3,8)	3,5 (0,0-5,3)	<0,001	0,798	0,035
Factores de Riesgo						
Antibióticos	141 (92,8%)	25 (65,8%)	8 (57,1%)	<0,001	0,001	0,746
Inhibidores de la bomba de protones	139 (91,4%)	11 (28,9%)	9 (64,3%)	<0,001	0,009	0,028
Sonde nasogástrica	25 (16,4%)	1 (2,6%)	0 (0,0%)	0,032	0,132	1,000
Enfermedad inflamatoria intestinal	8 (5,3%)	7 (18,4%)	4 (28,6%)	0,014	0,011	0,460
Cirugía	36 (23,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	<0,001	0,042	1,000
Ventilación mecánica	25 (16,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,005	0,132	1,000
SAMR	8 (5,3%)	1 (2,6%)	0 (0,0%)	0,690	1,000	1,000
Quimioterapia	23 (15,1%)	3 (7,9%)	2 (14,3%)	0,302	1,000	0,602
Ingreso previo en A. Digestivo	32 (21,1%)	4 (10,5%)	6 (42,9%)	0,169	0,091	0,016
Diálisis	17 (11,2%)	1 (2,6%)	1 (7,1%)	0,131	1,000	0,470
Episodio ICD						
Leve-moderado	124 (81,6%)	35 (92,1%)	12 (85,7%)	0,144	1,000	0,602
Grave-grave complicado	28 (18,4%)	3 (7,9%)	2 (14,3%)	0,144	1,000	0,602
Dolor	57 (37,7%)	24 (64,9%)	5 (35,7%)	0,005	1,000	0,111
Diarrea, días, mediana (RIQ)	3,0 (2,0-4,0)	5,0 (3,0-9,8)	4,5 (2,0-12,3)	<0,001	0,015	0,785
Sospecha clínica ICD	147 (96,7%)	21 (55,3%)	10 (71,4%)	<0,001	0,003	0,353
Tratamiento ICD	136 (89,5%)	27 (71,1%)	9 (64,3%)	0,008	0,019	0,738
Recurrencia	26 (17,1%)	4 (10,5%)	3 (21,4%)	0,456	0,713	0,370
Mortalidad global	17 (11,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,026	0,365	1,000
Mortalidad relacionada ICD	5 (3,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,585	1,000	1,000

2.6 Reclasificación de los episodios de ICD comunitario según criterios de exposición.

Se reevaluaron los casos comunitarios (n=38) en función del grado de exposición al sistema, encontramos que un 65,8% de estos pacientes había tenido un nivel alto de exposición al sistema sanitario. En la tabla 9 se muestra de manera más detallada el nivel de exposición de estos pacientes.

Tabla 9. Reclasificación de los episodios de ICD comunitario según criterios de exposición.

Tipo de Exposición al Sistema	Número de Pacientes (%)
Sanitario	n=38
Ninguno	6 (15,8%)
Bajo (Consultas Externas)	7 (18,4%)
Alto^a	25 (65,8%)
Cirugía ambulatoria ^a	1/25
Ingreso sin pernoctación ^a	6/25
Servicio de urgencias ^a	18/25
Diálisis ^a	1/25
Quimioterapia ^a	3/25
Trabajador sanitario ^a	1/25

a: Las variables no se excluyen mutuamente.

3. Factores de riesgo (predictores clínicos) de mala evolución

Del total de los 204 casos incluidos, 45 (22,1%) tuvieron un mala evolución, de ellos 33 (16,2%) fueron recurrentes, 4 (2,0%) se consideraron como fracasos terapéuticos y 8 (3,9%) progresaron hacia mayor gravedad. Se observaron 2 casos de colitis pseudomembranosa, la mortalidad global fue de un 8,3% y la mortalidad atribuible a la ICD fue de un 2,5%.

3.1 Comparación entre los pacientes con y sin mala evolución del episodio de ICD (Tabla 10).

Los pacientes que presentaron una mala evolución del episodio de ICD, fueron significativamente más mayores (mediana de edad, 74,7% vs 66,6; $p=0,032$), tenían menos frecuentemente una enfermedad de base no fatal (82,2% vs 93,1%; $p=0,040$) y un índice de comorbilidad de Charlson más alto (3 vs 2; $p=0,014$). No encontramos diferencias en el tipo de enfermedades de base salvo para las neoplasias, que fueron significativamente más frecuentes en aquellos pacientes con mala evolución (35,6% vs 18,9%; $p=0,026$).

No encontramos diferencias entre los grupos en cuanto a los factores de riesgo, presencia de dolor abdominal, duración de la diarrea y lugar de adquisición del episodio. Sin embargo, el episodio fue inicialmente más severo en aquellos pacientes con mala evolución (31,1% vs 11,9%; $p=0,005$) que en aquellos con una evolución más favorable. Los pacientes con una mala evolución tuvieron significativamente una estancia global (34,0 vs 19,0 días) y posterior al episodio (16,0 días vs 8,5 días) más larga, como cabía esperar.

Tabla 10. Comparación entre los pacientes con y sin mala evolución del episodio de ICD.

Características	Mala Evolución n=45	Evolución Favorable n=159	p valor
Datos demográficos			
Varón	22 (48,9%)	85 (53,5%)	0,615
Edad, años, mediana (RIQ)	74,7 (60,4-83,1)	66,6 (47,9-81,0)	0,032
McCabe y Jackson			
No-fatal	37 (82,2%)	148 (93,1%)	0,040
Últimamente fatal	7 (15,6%)	11 (6,9%)	0,080
Rápidamente fatal	1 (2,2%)	0 (0,0%)	0,221
Enfermedad de Base			
Ninguna	1 (2,2%)	11 (6,9%)	0,471
Trasplantado	1 (2,2%)	13 (8,2%)	0,313
Cardiovascular	13 (28,9%)	28 (17,6%)	0,138
Neoplasia	16 (35,6%)	30 (18,9%)	0,026
Neurológica	3 (6,7%)	16 (10,1%)	0,771
Gastrointestinal	3 (6,7%)	14 (8,8%)	0,769
Índice Charlson, mediana (RIQ)	3,0 (1,0-5,5)	2,0 (0,0-4,0)	0,014
Factores de Riesgo			
Antibióticos	42 (93,3%)	132 (83,0%)	0,098
Inhibidores de la bomba de protones	39 (86,7%)	120 (75,5%)	0,153
Sonde nasogástrica	7 (15,6%)	19 (11,9%)	0,612
Enfermedad inflamatoria intestinal	4 (8,9%)	15 (9,4%)	1,000
Cirugía	9 (20,0%)	27 (17,0%)	0,660
Ventilación mecánica	5 (11,1%)	20 (12,6%)	1,000
SAMR	3 (6,7%)	6 (3,8%)	0,417
Quimioterapia	9 (20,0%)	19 (11,9%)	0,218
Ingreso previo en A. Digestivo	10 (22,2%)	32 (20,1%)	0,452
Diálisis	6 (13,3%)	13 (8,2%)	0,381
Episodio ICD			
Leve-moderado	31 (68,9%)	140 (88,1%)	0,005
Grave-grave complicado	14 (31,1%)	19 (11,9%)	0,005
Dolor	21 (47,7%)	65 (41,1%)	0,492
Diarrea, días, mediana (RIQ)	3 (2-6)	3 (2-5)	0,489

En el momento del diagnóstico, los pacientes que posteriormente evolucionaron mal, tenían un recuento más bajo de linfocitos y unos niveles de creatinina sérica más elevadas y presentaron frecuentemente leucocitosis con un recuento de leucocitos >15,000 células/ μ l ($p < 0,05$). No encontramos diferencias significativas en el resto de parámetros analíticos estudiados (hemoglobina, plaquetas, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y niveles de urea) (Tabla 11).

Ochenta y un pacientes aceptaron firmar el consentimiento para la determinación de niveles de anticuerpos IgA e IgG frente a las toxinas A y B, pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 11).

Tabla 11. Parámetros analíticos de pacientes con ICD en función de su evolución

Parámetros Analíticos	Mala Evolución n=45	Evolución Favorable n=159	p valor
En el momento del diagnóstico			
Leucocitos, mediana (RIQ)	10,250 (4,800-16,950)	9,200 (6,500-12,600)	0,810
Leucocitos >15,000 células/ μ l	14/44 (31,8%)	20/155 (12,9%)	0,006
Linfocitos, mediana (RIQ)	1 (0,5-1,5)	1,3 (0,8-1,8)	0,017
Hemoglobina, media (DS)	10,9 (\pm 1,7)	11,4 (\pm 2,3)	0,204
Plaquetas, media (DS)	236,364 (\pm 143,368)	234,923 (\pm 119,665)	0,946
Creatinina, mediana (RIQ)	1,05 (0,7-1,5)	0,84 (0,6-1,3)	0,047
Urea, mediana (RIQ)	49,5 (31-84)	38 (26-67)	0,054
Día + 3 Toxina A IgA Mediana (RIQ)	0,35 (0,25-0,60)	0,24 (0,17-0, 40)	0,022
Día + 3 Toxina A IgG Mediana (RIQ)	0,24 (0,18-0,35)	0,21 (0,10-0,31)	0,152
Día + 3 Toxina B IgA Mediana (RIQ)	0,32 (0,20-0,46)	0,23 (0,15-0,41)	0,076
Día + 3 Toxina B IgG Mediana (RIQ)	0,17 (0,13-0,20)	0,15 (0,10-0,21)	0,392
Día + 12 Toxina A IgA Mediana (RIQ)	0,35 (0,21-0,52)	0,23 (0,15-0,32)	0,283
Día + 12 Toxina A IgG Mediana (RIQ)	0,17 (0,10-0,27)	0,15 (0,12-0,22)	0,408
Día + 12 Toxina B IgA Mediana (RIQ)	0,26 (0,22-0,48)	0,24 (0,11-0,32)	0,157
Día + 12 Toxina B IgG Mediana (RIQ)	0,14 (0,09-0,29)	0,13 (0,09-0,20)	0,990

3.2 Regla clínica para la predicción de mala evolución de los pacientes con ICD (Tabla 12).

Para desarrollar una regla de predicción clínica de mala evolución de los pacientes con ICD, aplicamos un modelo de regresión logística que incluyó las siguientes variables clínicas: sexo femenino, edad > 60 años, índice de comorbilidad de Charlson > 2, recuento de leucocitos > 15.000 células/μl (Tabla 12).

Para evitar, cualquier posible sesgo, para este análisis se seleccionó únicamente a aquellos pacientes que hubieran recibido una terapia antibiótica adecuada durante al menos 5 días y que tuvieran todos los datos completos para las variables de estudio (n=159).

La curva ROC de la regla de predicción clínica dio un resultado de AUC de 0,732 (95% IC, 0,630-0,835). Para una puntuación del score > 5 (riesgo elevado de mala evolución), el valor de sensibilidad fue del 77,1% (95% IC, 60,98%-87,93%) y la especificidad de 59,6% (95% IC, 50,47%-68,20%), con un VPP de 37,0% (95% IC, 31,34%-48,06%) y un VPN de 89,5% (95% IC, 82,57%-96,37%). La precisión diagnóstica del score clínico fue de 63,8% (95% IC, 56,04%-71,48%).

Tabla 12. Regla clínica de predicción de mala evolución de ICD

Variable	Odds Ratio	95% IC	Puntos
Sexo (Femenino)	2,107	0,888-4,707	3
Edad >60 años	1,823	0,872-5,706	2
Índice de Charlson >2	3,532	1,653-9,773	4
Leucocitos >15,000 células/μl	3,675	1,238-8,017	4
PUNTUACIÓN TOTAL =13 PUNTOS			

4. Factores de riesgo microbiológicos de mala evolución (combinación de predictores clínicos y microbiológicos)

4.1 Características microbiológicas de las cepas de *C. difficile*

4.1.1 Concentración de unidades formadoras de colonia de CDT/gramo

La mediana de número de ufc presentes por gramo de heces de los pacientes fue de $5,9 \times 10^5$. La distribución de la cantidad de ufc/gramo de las muestras estudiadas puede observarse en la Figura 63.

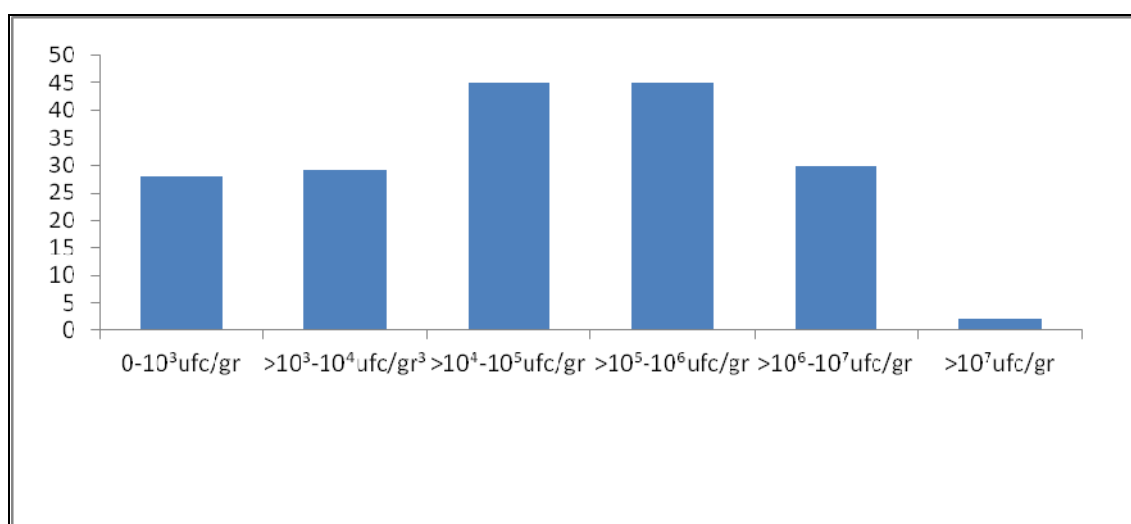


Fig. 63. Distribución de la cantidad ufc/gramo de las cepas *C. difficile* toxigénicas

4.1.2 Concentración de toxina/gramo

La mediana de la cantidad de toxina expresada por cepa a igual concentración de ufc, fue de 1,82 unidades de ELISA. La distribución de la cantidad de toxina expresada por las cepas estudiadas está representada en la siguiente figura (Figura 64).

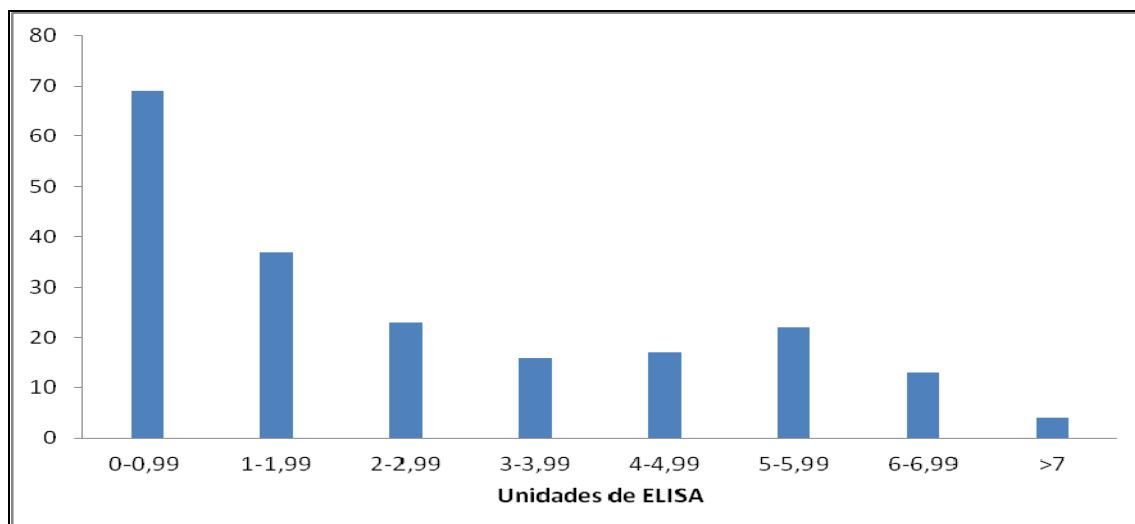


Fig. 64 Distribución de la cantidad de toxina de las cepas de *C. difficile* toxigénico

La cantidad de toxina presente por gramo de heces, depende de la cantidad de ufc presentes en la muestra, de esta forma, la mediana de la cantidad de toxina/gr fue de 0,008 unidades ELISA/gr. La distribución de la cantidad de toxina presente por gramo de heces de las muestras estudiadas se representa en la Figura 65.

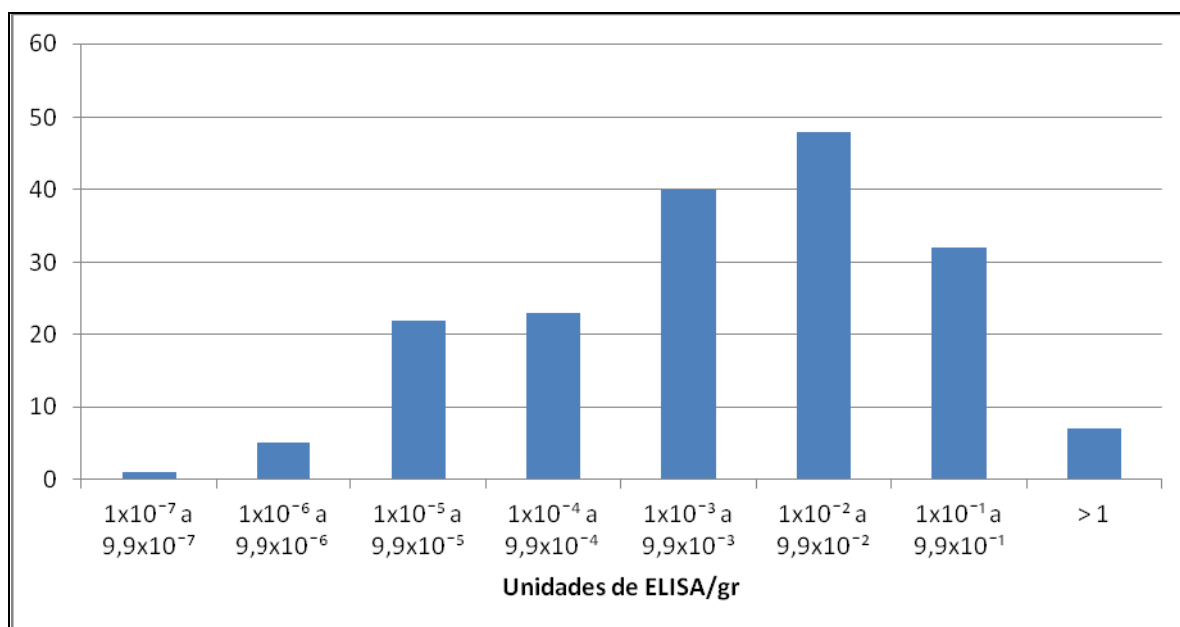


Fig. 65 Distribución de la cantidad de toxina presente por gramo de heces

4.1.3 Tasa de Esporulación

La mediana de la tasa de esporulación de las cepas estudiadas fue de 0.77. La distribución de la tasa de esporulación de la totalidad de las cepas se representa en la Fig 66.

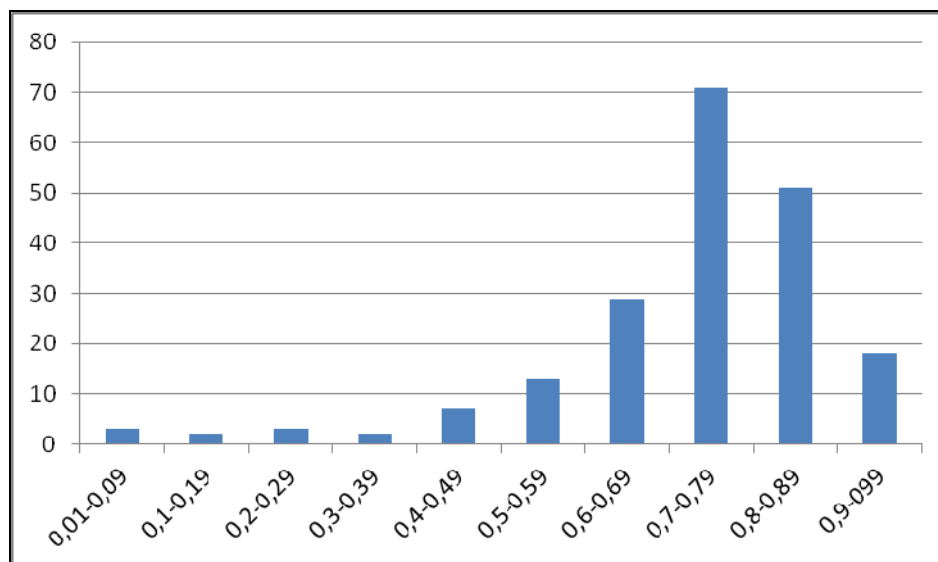


Fig. 66 Distribución de la tasa de esporulación

4.1.4 Tasa de Germinación

La mediana de la tasa de germinación de las cepas estudiadas fue de 1.3×10^{-4} . La distribución de la tasa de germinación de la totalidad de las cepas cantidad se muestra en la Figura 67.

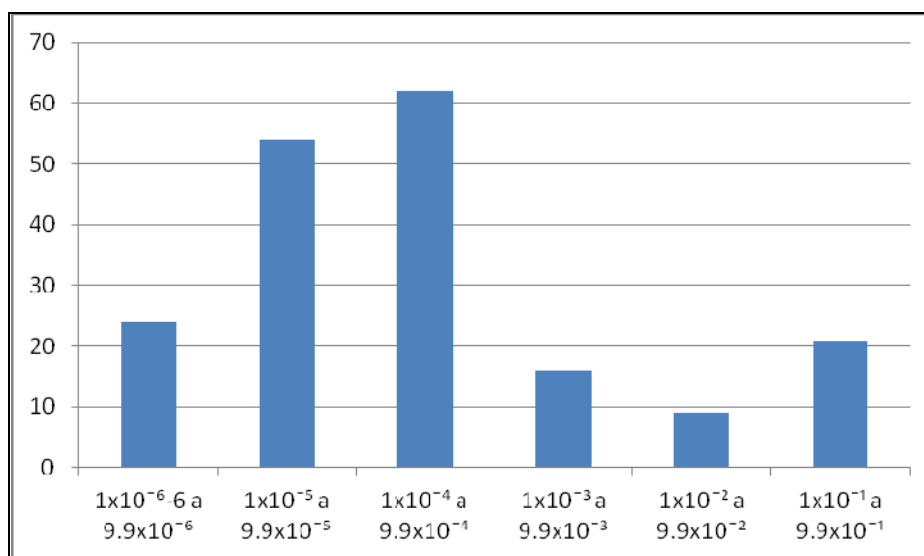


Fig. 67 Distribución de la tasa de germinación

4.1.5 Sensibilidad antimicrobiana

Los rangos de las CMI_s, CMI₅₀, CMI₉₀ y media geométrica de las cepas estudiadas (n=276) frente a todos los antibióticos testados, por el método de dilución en agar, se muestran en la tabla 13.

Los antibióticos con una CMI₉₀ más baja fueron fidaxomicina (0,25 mg/L) y tigeciclina (0.25 mg/L), seguidos por surotomicina (0.5 mg/L) y metronidazol (0.5 mg/L). La resistencia a clindamicina (≥ 8 mg/L), moxifloxacino (≥ 8 mg/L), y rifaximina (≥ 32 mg/L) fue, respectivamente, 55,1%, 49,6%, and 32,2%.

Tabla 13. Distribución de las CMI_s y media geométrica de las cepas de *C. difficile*

Antibiótico	Rango (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	Media Geométrica(mg/L)
Surotomicina	$\leq 0,06$ -2	0,25	0,5	0,314468
Fidaxomicina	$\leq 0,015$ -0,25	0,06	0,25	0,05531866
Metronidazol	0,06-1	0,25	0,5	0,241933
Vancomicina	0,125-2	0,5	1	0,500000
Clindamicina	0,125->256	8	256	14,6168975
Rifaximina	0,0019->256	0,015	>256	0,2533947
Moxifloxacino	0,125-32	4	32	5,475150
Tigeciclina	$\leq 0,03$ -0.50	0,125	0,25	0,091441

En cuanto, a sensibilidad de las cepas estudiadas frente a metronidazol por el método E-test en fresco, la CMI₅₀, CMI₉₀ y media geométrica fueron respectivamente, 0,19, 0,38 y 0,177 mg/L. El valor de la mediana del halo de inhibición de las cepas en fresco estudiadas por el método de difusión de disco-placa fue de 35mm.

4.2 Comparación de las características microbiológicas de las cepas de *C. difficile* asociadas a episodios de mala evolución de la ICD con aquellas cepas de episodios con evolución favorable (Tabla 14).

No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre aquellas cepas de primer episodio asociadas a mala evolución de la ICD y las relacionadas a una evolución favorable en cuanto a tasa de esporulación, tasa de germinación y sensibilidad antibiótica ($p>0,05$).

Encontramos que una mayor cantidad de ufc CDT/gr ($p=0,001$) y de cantidad de toxina/gr de muestra ($p=0.004$) se asociaba a una peor evolución del episodio

Tabla 14. Características microbiológicas de los aislados de *C. difficile*

Características Microbiológicas	Global n=204	ICD con mala evolución (n=45)	ICD sin mala evolución (n=159)	p valor
ufc CDT /gr, mediana (RIQ)	5.9×10^5 (4.8×10^4 - 4.4×10^6)	3.8×10^6 (1.7×10^5 - 1.7×10^7)	3.8×10^5 (4.3×10^4 - 3.2×10^6)	0.001
Toxina/gr, mediana (RIQ)	0.008 (0.0006- 0.0803)	0.05 (0.002-0.3)	0.005 (0.0005- 0.06)	0.004
EIA Toxina Positivo	95/173 (54.9%)	27/39 (69.2%)	68/134 (50.7%)	0.046
Citotoxicidad directa positiva	115/169 (68.0%)	28/36 (77.8%)	87/133 (65.4%)	0.226
Tasa esporulación, mediana RIQ)	0.77 (0.68-0.83)	0.77(0.67-0.83)	0.77 (0.68-0.83)	0.634
Tasa germinación, mediana (RIQ)	1.3×10^{-4} (1.8×10^{-5} - 7.5×10^{-4})	1.2×10^{-4} (1.9×10^{-5} - 7.9×10^{-4})	1.3×10^{-4} (1.6×10^{-5} - 7.6×10^{-4})	0.970
CMI Metronidazol (E-test) mediana (RIQ)	0.19 (0.94-0.38)	0.19(0.064-0.25)	0.19 (0.125- 0.38)	0.441
Disco Metronidazol (mm), media (DS)	35.4 (± 6.0)	35 (± 5.3)	35 (± 6.2)	0.922

4.3 Predictores microbiológicos de mala evolución: Regla de predicción combinada

Para crear una regla de predicción combinada (clínica y microbiológica) de mala evolución de la ICD, se realizó un modelo multivariable de regresión logística, incluyendo las siguientes variables: sexo femenino, edad > 60 años, índice de comorbilidad de Charlson >2, leucocitos >15,000/μl y cantidad de ufc de CDT/gr muestra >950,000 ufc/gr (Tabla 15). La curva ROC tuvo un AUC de 0,774 (95% IC, 0,674- 0,875).

Utilizando un punto de corte >8 puntos para un alto riesgo de mala evolución, la sensibilidad de la regla fue 77,1% (95% IC, 59,86%-89,55 %) y la especificidad 70,2% (95% IC, 60,89%-78,38%), con un VPP del 44,3% (95% IC, 31,55%-57,55 %) y un VPN del 90,9% (95% IC, 82,87%-95,98%). La precisión diagnóstica del score combinado fue de 71,8 % (95% IC, 63,87%-78,42%).

Tabla 15. Regla de predicción clínica y microbiológica de mala evolución de ICD.

Variable	Odds Ratio	95% CI	Puntos
Sexo (Femenino)	1.749	0.697-4.387	2
Edad >60 años	2.226	0.823-6.025	3
Índice Charlson >2	3.265	1.291-8.255	4
Leucocitos >15,000 células/μl	2.940	1.114-7.758	3
CDT >950.000 ufc/gr	3.440	1.438-8.231	4
PUNTUACIÓN TOTAL =16 PUNTOS			
Los pacientes con una puntuación de más de 8 se consideran en alto riesgo de mala evolución de ICD.			

5. Comportamiento clínico y evolución de la ICD en relación a las características moleculares.

5.1 Toxina Binaria

Durante el periodo de estudio de esta tesis doctoral, de los 204 episodios de ICD, 199 cepas representativas de otros tantos episodios estuvieron disponibles para análisis molecular. Se detectaron 31 episodios (15,6%) causados por 31 cepas que contenían la toxina binaria (Figura 68). En cinco de estos episodios además existía coinfección con una cepa no productora de toxina binaria.

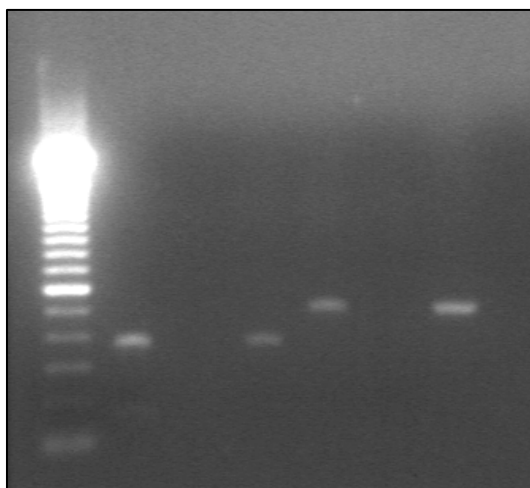


Fig. 68. Productos de PCR de los genes *cdtA* y *cdtB* de la toxina binaria.

De los 31 episodios de cepas con toxina binaria, 28 (90,3%) correspondían al ribotipo 078/126, en 2 no hubo correspondencia con ribotipos internacionales (R138 and R149), y 1 (3,2%) correspondía al ribotipo 023.

Las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes infectados con cepas productoras de toxina binaria y cepas no productoras de toxina binaria se muestran detalladamente en la tabla 16.

Los pacientes con ICD causada por cepas que contienen los genes de la toxina binaria eran más mayores (mediana de edad, 76,3 vs 67,4 años;

$p=0,042$), pero no encontramos otras diferencias en cuanto al tipo de enfermedad de base o comorbilidades. Tampoco se demostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en cuanto a factores de riesgo.

En lo referente al episodio de ICD, no se encontraron diferencias en tipo de ICD en función del lugar de adquisición (comunitario o relacionado con la asistencia sanitaria). En ambos grupos, la mayoría de los episodios fueron clasificados como leve a moderados (77,4% toxina binaria-positiva vs 85,1% toxina binaria-negativa; $p=0,292$), aunque un 6,5% de los episodios toxina binaria positivos fueron graves complicados comparado con un 0,6% de los episodios toxina binaria negativos. Sin embargo, esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p=0,064$).

Los pacientes infectados con una cepa toxina binaria positiva presentaron una mediana de un día más de diarrea (cepas toxina binaria positivas 4,0 días vs cepas toxina binaria negativas 3,0 días; $p=0,019$), sin embargo no hubo diferencias en cuanto a los días totales de estancia en el hospital ($p=0,124$) o a los días de estancia hospitalarios tras el diagnóstico del episodio de ICD ($p=0,488$).

No encontramos diferencias entre episodios de ICD toxina binaria positiva y toxina binaria negativa, en lo referente a recurrencias (16,1% vs 16,1%; $p=1,000$), en la mortalidad global (9,7% vs 8,3%; $p=0,733$) o mortalidad relacionada con el episodio de ICD (0,0% vs 3,0%; $p=1,000$) (Tabla 17).

Tabla 16. Comparación de las características clínicas de los pacientes con ICD causado por cepas toxina binaria positiva y por cepas toxina binaria negativa

Características	Total N = 199	Toxina Binaria Positiva n = 31	Toxina Binaria Negativa n = 168	p valor
Datos demográficos				
Varón	103 (51,8%)	19 (61,3%)	84 (50,0%)	0,328
Edad, años, mediana (RIQ)	69,1 (50,0-81,6)	76,3 (60,3-82,8)	67,4 (46,1-81,0)	0,042
McCabe y Jackson				
No-fatal	180 (90,5%)	28 (90,3%)	152 (90,5%)	1,000
Últimamente fatal	18 (9,0%)	3 (9,7%)	15 (8,9%)	1,000
Rápidamente fatal	1 (0,5%)	0 (0,0%)	1 (0,6%)	1,000
Índice Charlson, mediana (RIQ)	2,0 (0,0-4,0)	2,0 (1,0-4,0)	2,0 (0,0-5,0)	0,950
Factores de Riesgo				
Antibióticos	170 (85,4%)	27 (87,1%)	143 (85,1%)	1,000
Inhibidores de la bomba de protones	154 (77,4%)	25 (80,6%)	129 (76,8%)	0,816
Sonda nasogástrica	24 (12,1%)	3 (9,7%)	21 (12,5%)	1,000
Enfermedad inflamatoria intestinal	19 (9,5%)	5 (16,1%)	14 (8,3%)	0,186
Cirugía	36 (18,1%)	3 (9,7%)	33 (19,6%)	0,308
Ventilación mecánica	25 (12,6%)	1 (3,2%)	24 (14,3%)	0,136
Quimioterapia	27 (13,6%)	5 (16,1%)	22 (13,1%)	0,580
Díálisis	19 (9,5%)	1 (3,2%)	18 (10,7%)	0,319
Tipo Episodio ICD				
H-ICD	147 (73,9%)	20 (64,5%)	127 (75,6%)	0,265
C-ICD	38 (19,1%)	8 (25,8%)	30 (17,9%)	0,322
I-ICD	14 (7,0%)	3 (9,7%)	11 (6,5%)	0,462
Gravedad Episodio ICD				
Leve a moderado	167 (83,9%)	24 (77,4%)	143 (85,1%)	0,292
Grave	29 (14,6%)	5 (6,1%)	24 (14,3%)	0,784
Grave complicado	3 (1,5%)	2 (6,5%)	1 (0,6%)	0,064

Tabla 17. Comparación de la evolución del episodio de ICD causado por cepas toxina binaria positiva y aquellos episodios causados por cepas toxina binaria negativa

Características	Total N = 199	Toxina Binaria Positiva n = 31	Toxina Binaria Negativa n = 168	p valor
Evolución				
Días diarrea mediana (RIQ)	3,0 (2,0-5,0)	4,0 (3,0-6,0)	3,0 (2,0-5,0)	0,019
Días estancia total	21,0 (11,0-41,0)	17,0 (8,0-29,0)	21,5 (11,8-43,0)	0,124
Días estancia tras diagnóstico ICD	9,5 (4,5-17,5)	8,5 (4,5-16,5)	9,5 (4,5-19,0)	0,488
Recurrencia	32 (16,1%)	5 (16,1%)	27 (16,1%)	1,000
Fallo terapéutico	4 (2,0%)	0 (0,0%)	4 (2,4%)	1,000
Mortalidad global	17 (8,5%)	3 (9,7%)	14 (8,3%)	0,733
Mortalidad relacionada ICD	5 (2,5%)	0 (0,0%)	5 (3,0%)	1,000

Para determinar los factores de riesgo asociados a mala evolución de la ICD, realizamos un análisis bivariable entre las variables recogidas y la mala evolución. Todas las variables con una $p < 0,05$ y la variable toxina binaria se incluyeron en el análisis multivariable de regresión logística para evaluar su asociación con la mala evolución de la ICD. No se encontró ningún tipo de asociación entre la presencia de cepas con toxina binaria y mala evolución de la ICD ($p=0.701$; OR, 0.793; 95%CI, 0.243-2.591).

Así mismo, se realizaron análisis por separado frente a recurrencia, mortalidad y mortalidad asociada a la ICD. Ninguno de estos análisis reveló ninguna asociación con la presencia de toxina binaria ($p > 0,05$).

5.2 Ribotipos

Del total de los 204 episodios incluidos se pudo realizar el análisis molecular por ribotipado en 197 de los episodios. En el 98% de los episodios analizados se aisló un ribotipo único. El ribotipo mayoritario fue el 001(35,0%), seguido por 078/126 (14,7%), 014 (12,2%), 106 (10,7%), 207 (4,1%) y el resto de ribotipos fueron una miscelánea de ribotipos, cada uno de ellos se encontraban presente en menos de un 4% de los episodios. Los ribotipos aislados se muestran en detalle en la Figura 69.

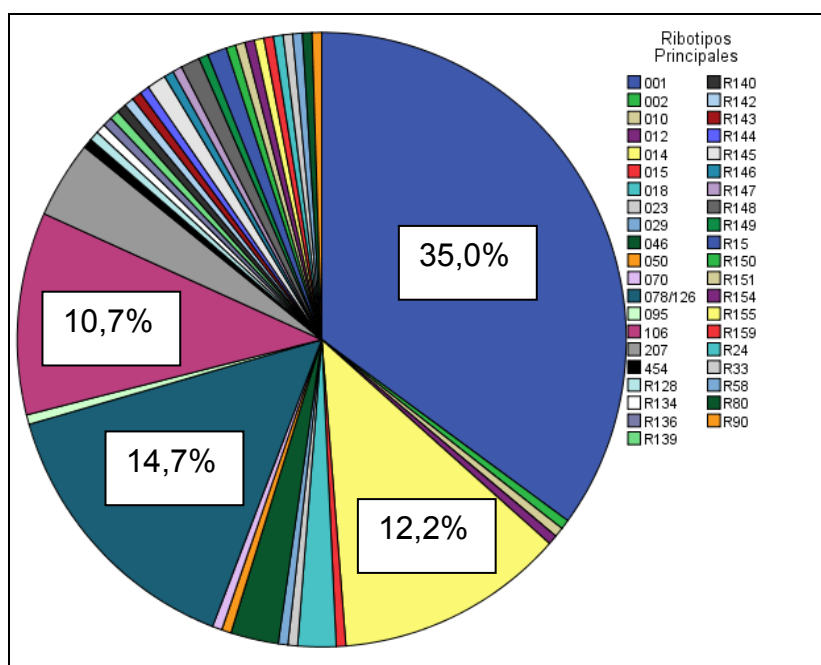


Fig. 69. Distribución de ribotipos de las cepas de *C. difficile*.

5.2.1. Comparación de los principales ribotipos de las cepas de *C. difficile*

Cuando analizamos las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con ICD en función de los cuatro ribotipos mayoritarios de las cepas de esta tesis, no encontramos diferencias entre los distintos ribotipos mayoritarios en cuanto a edad, sexo, ni al pronóstico de la enfermedad de base

según la clasificación de McCabe y Jackson. En cuanto al tipo de enfermedad de base, los pacientes con infección por ribotipo 001 eran más frecuentemente pacientes trasplantados ($p=0,013$), y la enfermedad nefro-urológica estuvo presente con más frecuencia en pacientes con infección por ribotipo 014 ($p=0,043$) que el resto de ribotipos.

En cuanto a los factores de riesgo clásicos para la ICD no encontramos diferencias estadísticamente significativas, salvo que el consumo previo de rifamicinas se asoció a las infecciones por el ribotipo 001 ($p=0,024$). Tampoco encontramos diferencias en lo referente a la gravedad del episodio en el momento del diagnóstico ni a la evolución del episodio (mala evolución, fracaso terapéutico, recurrencia, días de estancia global y posterior al episodio).

En lo referente al lugar de adquisición del episodio encontramos que el ribotipo 001 se asociaba más frecuentemente que el resto a la adquisición relacionada con la asistencia sanitaria ($p<0,001$), mientras que el ribotipo 106 se adquiría más frecuentemente que el resto de los ribotipos en la comunidad ($p=0,033$). Así mismo, los pacientes con este ribotipo presentaron un índice de comorbilidad de Charlson mucho menor que el resto de los ribotipos mayoritarios, aunque fue el de mayor duración de la diarrea.

En cuanto a las características microbiológicas, encontramos diferencias entre los distintos ribotipos mayoritarios en cuanto a la cantidad de ufc/gr, cantidad de toxina a igual cantidad de ufc, cantidad de toxina/gr heces, tasa de esporulación y tasa de germinación (Tabla 18).

Los ribotipos que se encontraron en mayor cantidad de ufc/gr de heces fueron los ribotipos 078/126 y 106. En cuanto a expresión de toxina, los ribotipos que expresaron una mayor cantidad de toxina en condiciones de igualdad de número de colonias fueron los ribotipos 106 y 001. En cuanto a

cantidad de toxina presente/gr de heces destaca el ribotipo 001 con una cantidad de toxina/gr muy superior al resto. El ribotipo 078/126 presentó una mayor capacidad de esporulación y de germinación que el resto de ribotipos mayoritarios.

Tabla 18. Características microbiológicas de los ribotipos mayoritarios

Características Microbiológicas	Ribotipo 001	Ribotipo 078/126	Ribotipo 014	Ribotipo 106	p Valor
CDT ufc/gr, mediana (RIQ)	4,2x10 ⁵ (3,4x10 ⁴ - 2,4x10 ⁶)	1,1x10 ⁶ (1,2x10 ⁵ - 8,9x10 ⁶)	3,2x10 ⁵ (2,4x10 ⁴ - 3,9x10 ⁶)	5,4x10 ⁶ (2,4x10 ⁶ - 1,2x10 ⁷)	0,003
Toxina/gr, mediana (RIQ)	0,017 (0,0013- 0,0566)	0.006 (0.0008-0.0767)	0.005 (0.0005-0.06)	0.071 (0.0163- 0.1698)	0,037
Toxina/ufc, mediana (RIQ)	3,51 (1,78-5,66)	0,87 (0,44-1,07)	1,65 (0,35- 4,67)	1,16 (0,66- 2,22)	<0,001
Tasa Esporulación, mediana (RIQ)	0,75 (0,70-0,80)	0,80 (0,74-0,86)	0,70 (0,58-0,76)	0,71 (0,64-0,78)	0,001
Tasa Germinación, mediana (RIQ)	2,0x10 ⁻⁴ (1,0x10 ⁻⁴ - 6,0x10 ⁻⁴)	0,12 (0,099-0,15)	1,4x10 ⁻⁵ (6,0x10 ⁻⁶ - 1,1x10 ⁻⁴)	1,1x10 ⁻⁵ (1,0x10 ⁻⁶ - 6,7x10 ⁻⁵)	<0,001

5.2.2. Evolución de los episodios de ICD en función de los principales ribotipos de las cepas de *C. difficile*.

Para determinar los factores de riesgo asociados a mala evolución de la ICD, realizamos un análisis bivariable entre las variables recogidas y la mala evolución. Todas las variables con una p<0,05 y las variables de los cuatro ribotipos mayoritarios se incluyeron en el análisis multivariable de regresión logística para evaluar su asociación con la mala evolución de la ICD. No se

encontró ningún tipo de asociación entre los principales ribotipos y mala evolución de la ICD ($p>0.05$).

Así mismo, se realizaron análisis por separado frente a recurrencia, mortalidad y mortalidad asociada a la ICD. Ninguno de estos análisis reveló ninguna asociación con ninguno de los ribotipos ($p>0,05$).

5.2.3. Caracterización molecular de los episodios de ICD recurrentes:

Recidiva y Reinfección.

De los 33 episodios recurrentes, se pudo realizar el análisis molecular en 30 de ellos. Observamos que un 76,7% de los episodios de primera recurrencia compartían la misma cepa, a nivel de ribotipo, que el episodio anterior, siendo considerados como recidivas. Por tanto, el porcentaje de episodios que fueron reinfecciones fue de 23,3%.

Aquellos episodios que tuvieron una segunda recurrencia, fueron en su mayoría recidivas (87,5%). El bajo número de episodios de terceras y cuartas recurrencias no permitió un análisis de esos datos.

DISCUSIÓN

La infección por *C. difficile* se ha convertido en un problema creciente en la mayoría de los hospitales de todo el mundo, llegando incluso a sustituir a *S. aureus* como primera causa de infección relacionada con la asistencia sanitaria [155]. Cada vez es más amplia la información publicada sobre este tema, lo que puede deberse a la mayor importancia que está recibiendo en los últimos años la infección nosocomial, debido, sobre todo, al aumento de los costes que produce por la prolongación de la estancia hospitalaria y al empeoramiento del estado de salud del enfermo [18, 468, 469].

En la última década, se ha observado un incremento de la incidencia de la ICD [4, 28-32], coincidiendo con los brotes en Canadá, Estados Unidos y Europa. Sin embargo, datos recientes tanto de Estados Unidos como de Europa sugieren que este incremento puede haber llegado a su fin [33, 34]. En el Reino Unido, la frecuencia de la ICD ha disminuido recientemente de manera significativa, pasando de 6.341 casos comunicados en el primer cuatrimestre del 2010 a 3.362 en el segundo cuatrimestre del 2013 [33]. En Estados Unidos, los datos del proyecto HCUP ("Healthcare Cost and Utilization Project") muestran un descenso del 2,5% en la tasa de altas hospitalarias con ICD del 2008 a 2009 [34]. Mermel y cols., han comunicado un descenso en la incidencia de 12,2 casos de ICD/1.000 altas durante el segundo cuatrimestre del 2006 a 3,6 casos ICD/1.000 altas en el tercer cuatrimestre del 2012 [37].

En el Hospital Gregorio Marañón, donde se ha realizado esta tesis, la incidencia sufrió un descenso en el número de casos de 10,7 casos/10.000 días de estancia en 2003 a 8,3 casos/10.000 días de estancia en 2012 (en vías de publicación). De manera más reciente, desde 2013, periodo en el que se llevó a cabo la presente tesis, se ha observado una tendencia al alza hasta la fecha actual. un incremento en el número de casos de ICD, de 8,9

episodios/10.000 estancias en Enero del 2013 a 13,3 episodios/10.000 estancias en Mayo del 2014, cuyas causas han sido investigadas y no parecen evidentes.

Este incremento no parece estar en relación con un aumento del porcentaje de positividad. Durante el periodo de estudio, el porcentaje de positividad detectado entre todas las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología en pacientes de más de 2 años, fue del 10%, cifra similar a la de años anteriores.

Así mismo, también se ha descrito una disminución en el grado de gravedad de los episodios de ICD [35-37]. En concordancia con los hallazgos de otros estudios recientes [38-40], observamos que la mayoría de los casos de ICD fueron leves o moderados. A pesar de que las tasas de mortalidad notificadas varían ampliamente, la mortalidad atribuida a la ICD ha sido tradicionalmente baja (menos de un 2% de los casos) [41-43]. De manera similar, observamos que tan solo el 1,5% de los pacientes requirió ingreso en una unidad de cuidados intensivos debido al episodio de ICD y la mortalidad atribuible al episodio de ICD fue del 2,5%.

Se observó una tasa de recurrencia del 16,2%, este hallazgo es consistente con las tasas que se notifican comúnmente de alrededor de un 20% [44, 45]. Se han descritos muchos factores de riesgo para la R-ICD [13, 38, 46, 47]; sin embargo pocos estudios prospectivos o validados han investigado los predictores clínicos de recurrencia [48, 49]. Con los datos obtenidos en esta tesis, no se logró demostrar ningún marcador temprano de R-ICD. Consecuentemente, es necesario un marcador más preciso para la predicción de R-CDI que identifique a aquellos pacientes en alto riesgo de sufrir una R-ICD [49]. En este estudio, los pacientes con R-ICD no tuvieron un mayor

riesgo de mortalidad global o atribuible al episodio, aunque sí tuvieron una estancia hospitalaria más larga y recibieron más días de tratamiento antibiótico.

El número de casos de ICD de origen comunitario parece estar sufriendo un aumento [50-52], con tasas de incidencia que oscilan entre 7,7 a 29,5 episodios/100.000 habitantes [53-57], incluso llegando a representar un 41% de todos los casos en un estudio poblacional [55]. En el estudio realizado en esta tesis, la incidencia de casos comunitarios fue de 23,9/100.000 habitantes, suponiendo un 18,6% de todos los casos. Este hallazgo es consistente con datos recientemente publicados [27, 45, 57, 58]. Cuando se analizaron los casos comunitarios por su exposición al sistema sanitario como pacientes ambulantes o ingresados sin pernoctación hospitalaria, se observa que 2 de cada 3 de estos episodios, realmente habían tenido una alta exposición al sistema sanitario. Recientemente, Chitnis y cols. observaron que el 82% de los casos clasificados como comunitarios según las definiciones de las guías internacionales, habían tenido algún nivel de exposición al sistema sanitario en las 12 semanas anteriores al episodio de ICD y tan solo el 18% no tuvo ningún tipo de exposición [27]. De manera consecuente, debemos preguntarnos si necesitamos una definición más completa de lo que se considera ICD de adquisición en la comunidad y relacionada con la asistencia sanitaria.

Los pacientes con C-ICD eran más jóvenes y tenían menos frecuentemente enfermedades de base, presentaron menos frecuentemente neoplasias y enfermedades cardiovasculares y en general tuvieron menos comorbilidades. Estudios previos en C-ICD, habían revelado hallazgos similares [58, 59]. Los factores de riesgo clásicos asociados a la ICD, eran menos frecuentes en aquellos pacientes con C-ICD que los pacientes con H-ICD. En este estudio, el 31,4% de los pacientes con C-ICD no habían recibido

previamente antibióticos. Algunos estudios, han llegado a demostrar porcentajes incluso mayores, hasta de un 60% de pacientes sin tratamiento antibiótico previo al episodio [59, 60].

La información acerca de la evolución de los episodios de ICD suele generarse en centros donde la búsqueda de *C. difficile* no se realiza de manera habitual en pacientes no hospitalizados, por lo que la evolución de este tipo de episodios no se conoce bien. Se observó que la mayoría de los episodios de C-ICD fueron leves o moderados, con sólo un 8,3% de los episodios considerados como graves. No se detectaron casos fatales y este hallazgo es consistente con los datos de uno de los pocos estudios realizados hasta el momento en población no hospitalizada, en el cual se demostró un 6% de pacientes graves y una mortalidad a los 30 días de un 1,6% [27].

La introducción de un sistema de búsqueda sistemática de *C. difficile* toxigénico en todas las muestras de heces no formes, reveló que existe un porcentaje nada despreciable de casos que pasan inadvertidos por falta de sospecha clínica de ICD y además proporciona un panorama más completo de lo que supone la infección por ICD en una población no seleccionada. Los factores de riesgo para la falta de sospecha clínica fueron episodios de ICD adquiridos en la comunidad y la edad joven. Este estudio demuestra que en un entorno de baja prevalencia de ribotipo 027, la ICD se comporta mayoritariamente de manera no grave y que es principalmente una infección relacionada con el sistema sanitario, con una tasa de mortalidad relativamente baja.

En un reciente estudio nacional español llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, ya se había señalado que en nuestro país, 2 de cada 3 episodios de ICD no es diagnosticado o es diagnosticado erróneamente debido

a la falta de pruebas diagnósticas de adecuada sensibilidad o debida a la falta se sospecha y solicitud del médico tratante [61]. En el presente estudio, recuperamos una proporción significativa de casos (12,7%) que no hubieran sido diagnosticados debido a la falta de sospecha clínica, de no haberse implementado este sistema de búsqueda sistematizada de *C. difficile* toxigénico.

Esta aproximación es claramente beneficiosa desde la perspectiva individual del paciente que es diagnosticado, y desde la perspectiva epidemiológica de control de la infección. Más aún, esta estrategia puede aliviar la carga económica que supone la ICD en España, que ha sido estimada en 3.901€ para una infección inicial, 4.875€ para una primera recurrencia y en 5916€ para una segunda recurrencia [62]. En este estudio, para recuperar un caso no sospechado por el clínico, se tuvieron que testar 49 muestras sin petición por parte del clínico, que en nuestra institución supuso un coste de 735€. Esta estrategia parece coste-efectiva ya que el diagnóstico de un caso de ICD, desencadena medidas tanto de control de la infección hospitalaria (resultando en una reducción del número de casos secundarios al caso índice) como medidas terapéuticas apropiadas que pueden prevenir complicaciones costosas.

Los pacientes con una ICD no sospechada, comparado con los pacientes en los que sí se sospechó este tipo de infección, fueron más jóvenes, menos frecuentemente tenían enfermedades de base como neoplasias y presentaban más frecuentemente enfermedad gastrointestinal como enfermedad principal. La mayoría de los casos no sospechados carecían de los factores de riesgo conocidos clásicamente para la ICD, esto sugiere que

existen otros factores que influyen en la ICD no bien conocidos hasta el momento.

El dolor abdominal fue más común en los casos no sospechados, sin embargo la gravedad de la infección y la evolución fueron similares a aquellos episodios que habían levantado una sospecha diagnóstica de ICD.

Hasta el momento, no se han descrito cuales son los factores de riesgo para el infradiagnóstico de esta infección. En este estudio se revelan por primera vez estos factores, la edad joven y el origen comunitario de la ICD se asocian de manera independiente a la falta de sospecha clínica de la ICD.

En nuestra institución, la evolución de los pacientes fue mala en un 22,1% de los casos. La regla de predicción clínica derivada de los resultados de este estudio incluye como predictores de mala evolución la edad avanzada, sexo femenino, presencia de comorbilidades, leucocitosis con un recuento superior a 15.000 células/ μ l. La regla de predicción fue mejorada especialmente en cuanto a especificidad por la incorporación de la variable de alto número de ufc de CDT/gramo de muestra como marcador microbiológico de mala evolución. La regla de predicción combinada incluye marcadores pronósticos de todas las situaciones de mala evolución que se beneficiarían de un cambio temprano a otras opciones terapéuticas.

Los factores de riesgo clínicos como la edad avanzada, presencia de comorbilidades y leucocitosis con un recuento superior a 15.000 células/ μ l, estaban en consonancia con los resultados de otros investigadores [48, 63-67]. Los factores de riesgo o predictores clínicos descritos en otros estudios como tratamiento previo con inhibidores de la bomba de protones, linfopenia, presencia de sonda nasogástrica, cirugía, diálisis, ingresos previos en un servicio de aparato digestivo y aislamiento previo de *Staphylococcus aureus*

meticilin-resistente [38, 68-70] , no estaban asociados en nuestro estudio a una mala evolución o no tuvieron la suficiente potencia estadística y por ello no fueron incluidos en la regla de predicción clínica.

Ciertos factores inmunológicos del paciente con ICD como una respuesta inmune disminuida se han asociado con un elevado riesgo de recurrencia en varios estudios [16, 71, 72]. Sin embargo, en este estudio no se encontró correlación alguna entre los niveles de anticuerpos antitoxina y la mala evolución de los episodios de ICD. En el estudio realizado por Hu y cols., la concentración sérica de IgG frente a la toxina A se incluyó en un modelo de predicción, los resultados de esta inclusión no fueron bien en la cohorte de validación de la regla de predicción y no sirvió para mejorar la regla de predicción [48].

Varios factores microbiológicos, como la esporulación y la germinación, juegan un importante papel en la patogenia de la ICD [73, 74], y han sido asociados de manera reciente con casos graves de ICD y R-ICD [14, 75]. Sin embargo, los datos existentes son muy limitados y contradictorios [14, 76]. En este estudio, las tasas de esporulación y germinación más elevadas no estaban correlacionadas con la mala evolución de los pacientes con ICD.

Se piensa que la expresión de toxina se asocia al nivel de gravedad de la ICD [77], y se ha descrito una asociación en ratones entre niveles altos de toxina en heces y recuentos de colonias de *C. difficile* [78]. Los hallazgos de un estudio en el que se comparaba la cuantificación de *C. difficile* y la detección de toxina, realizado por Leslie y cols.[79], sugiere que la cuantificación de *C. difficile* podría utilizarse como predictor del status del nivel de toxina. En el estudio que presenta esta tesis, se halló que la cantidad de ufc de *C. difficile* toxigénico presentes en el momento del diagnóstico se asociaba con la

evolución de la ICD, posiblemente actuando como marcador del nivel de toxina producido. Otros factores microbiológicos como un resultado positivo en el ensayo de citotoxicidad directa en heces, un resultado positivo de presencia de toxina por enzimo-inmunoanálisis, así como la cuantificación de toxina no se asoció de manera independiente a la mala evolución de la ICD. Una posible explicación podría ser que estas variables se encuentran correlacionadas con la carga bacteriana, y que esta última tiene una mayor capacidad de predicción de mala evolución de la ICD.

Las reglas de predicción existentes varían ampliamente y se centran bien en la predicción de recurrencia [48, 68], o en la gravedad de la ICD [63, 80, 81], o bien en la mortalidad [64-66]. Con los resultados derivados de este estudio se propone una regla de predicción que abarca todas las situaciones desfavorables anteriores con el fin de asegurar una terapia antibiótica apropiada en el momento oportuno. Una de las pocas reglas de predicción que aportan sus valores de validez es la del estudio realizado por Hu y cols. [48, 80, 82], que tuvo una sensibilidad de tan solo un 54%. La sensibilidad de la regla de predicción propuesta alcanza un valor mucho mayor (77,1%). Mientras que la mayoría de reglas de predicción están basadas en pacientes ingresados en un centro hospitalario y por tanto de aplicación única en dichos pacientes [80, 82], la que aquí se propone incluye también a pacientes ambulatorios.

En nuestra institución, los episodios de ICD causados por cepas de *C. difficile* que contienen los genes de la toxina binaria supusieron un 15,6% de todos los episodios. Ninguna de estas cepas correspondió con el ribotipo 027; la mayoría de las cepas toxina binaria positivas correspondían al ribotipo 078/126. Se encontró que la presencia de cepas conteniendo genes para la

toxina binaria no estaban relacionados con una mala evolución de los pacientes.

Desde que se describió por primera vez la toxina binaria en 1988, por Popoff y cols. [83], la prevalencia de las cepas toxina binaria positiva ha sido relativamente baja (6,4%) [84]. Sin embargo desde los brotes causados por *C. difficile* ribotipo 027/NAP1/BI en Europa, Canadá y Estados Unidos, se ha observado un incremento en la prevalencia, llegando a suponer hasta un 82% de todas las cepas durante los brotes [85-87]. En este estudio la prevalencia fue similar a la descrita por otros entornos con baja prevalencia de ribotipo 027 [61, 88, 89].

En dos estudios retrospectivos llevados a cabo por Barbut y cols. [88, 93], se encontró una asociación entre la presencia de toxina binaria y gravedad de la ICD. Sin embargo, en este estudio, no se encontró ninguna asociación entre gravedad de la ICD y cepas toxina binaria positivas. En otro estudio prospectivo reciente tampoco se observó una asociación significativa entre toxina binaria y gravedad [94].

La presencia de la toxina binaria también se ha relacionado con un mayor riesgo de R-ICD [95]. En este estudio se observó que la frecuencia de la tasa de recurrencia era la misma (16,1%) en aquellos pacientes con ICD toxina binaria positiva y toxina binaria negativa. En otros estudios recientes también se ha observado esta falta de asociación entre presencia de toxina binaria y recurrencia [94, 96].

En un estudio retrospectivo de registro de datos, se observó una mayor mortalidad en aquellos pacientes que tenían una ICD positiva para toxina binaria que en aquellos toxina binaria negativa [97]. En el estudio que presenta esta tesis, no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa

entre mortalidad global de los casos toxina binaria positiva y toxina binaria negativa. De hecho, todos los casos de mortalidad atribuible a la ICD ocurrieron en pacientes con ICD toxina binaria negativa. Estos hallazgos están en consonancia con los resultados publicados por Kim y cols. [94].

En nuestra institución los ribotipos mayoritarios fueron el 001 (35,0%), seguido por 078/126 (14,7%), 014 (12,2%), 106 (10,7%), 207 (4,1%), que difiere algo de la prevalencia encontrada en estudio nacional realizado en España se observó que los ribotipos predominantes fueron en primer lugar el 014 (20,5), seguido del 001(18,2%) y del 078/126 (18,2%)[61]. Estos resultados apuntan hacia una variabilidad regional existente en las cepas circulantes.

En lo referente al lugar de adquisición del episodio, algunos estudios han relacionado al ribotipo 078 con la ICD de origen comunitario [90, 470], sin embargo en este estudio encontramos que el ribotipo que se asociaba con la C-ICD fue el 106 y no el 078/126. Así mismo encontramos que el ribotipo 001 se asociaba más frecuentemente que el resto a la adquisición relacionada con la asistencia sanitaria.

Actualmente, la asociación entre la evolución de los pacientes y ribotipos específicos está siendo objeto de debate, existen estudios en entornos no epidémicos en los que no se ha encontrado una asociación entre los ribotipos denominados como "hipervirulentos" 027 y 078 y la gravedad de la ICD [91, 92]. En este estudio no encontramos ninguna asociación entre mala evolución de la ICD y ribotipo.

Las pruebas de ribotipado mostraron que el 76,7% de las recurrencias fueron recidivas (episodios causados por la misma cepa). Este porcentaje fue similar al descrito recientemente por Oka y cols. [14], que se situó en un 80,0%. Otros estudios previos muestran porcentajes de recidivas muy variados que

oscilan entre el 25% al 87,5% [471-475], incluyendo un estudio realizado en nuestra institución en el año 2001 que mostró un porcentaje del 64%, pero este estudio fue realizado únicamente en pacientes VIH positivos [471].

Se ha postulado que las recidivas pueden ocurrir de manera más frecuente en cepas que tengan características fenotípicas más ventajosas. De hecho se ha comunicado en varios estudios que las cepas epidémicas de *C. difficile* producían más esporas que las otras cepas [14, 459]. Como demuestra la presente tesis, las características fenotípicas y genotípicas de las cepas no estarían asociadas realmente a una mayor frecuencia de producir recurrencias. A pesar de que el ribotipo 078/126 presentó una mayor capacidad de esporulación y de germinación que el resto de ribotipos mayoritarios no observamos ninguna correlación entre este ribotipo y recurrencia o mala evolución en general.

Es importante determinar el estado de resistencia de las cepas y su correlación con los distintos ribotipos. Encontramos que todas las cepas eran sensibles a vancomicina y metronidazol, al igual que la mayoría de estudios que lo han evaluado [476-478]. Metronidazol y vancomicina han sido las opciones terapéuticas principales durante los últimos 30 años para el tratamiento de la ICD. Sin embargo, la necesidad de nuevos fármacos para el tratamiento de la ICD es evidente debido a las desventajas que presentan actualmente los tratamientos vigentes para la ICD, tales como el fallo terapéutico, el desarrollo de cepas de enterococo vancomicina-resistentes y la alta tasa de recurrencias [1, 263].

Fidaxomicina ha sido recientemente aprobada para el tratamiento de la ICD [263]. En nuestro estudio no se pudo determinar el grado de eficacia y la ventaja en cuanto a una menor tasa de recurrencia respecto al tratamiento

convencional debido al bajo número de pacientes que recibieron este fármaco, principalmente por su elevado coste. Sin embargo en el estudio *in vitro* pudimos observar su excelente actividad frente a todas las cepas con CMI's similares a las comunicadas previamente por diversos autores [479, 480].

Surotomicina ha completado de manera exitosa los ensayos de fase 2, en los que este fármaco demostró tasas de curación sostenida más elevadas que las de vancomicina [408]. Un estudio publicado recientemente ha demostrado que la resistencia a surotomicina es un suceso poco probable en cepas de *C. difficile*, *E. faecalis*, y *E. faecium* (enterococos vancomicina-resistentes y vancomicina-sensibles) [409]. Surotomicina se encuentra actualmente en ensayo clínico de fase 3 para el tratamiento de la ICD, con una posología de 250 mg, dos veces al día, durante 10 días.

En el presente estudio, surotomicina demostró una excelente actividad, con unas CMI₅₀ y CMI₉₀ frente a las cepas recogidas en este estudio durante 2013, similares a las descritas previamente por Citron y cols. frente a cepas recogidas en 2005-2008 [406]. Snyderman y cols. observaron resultados similares en un estudio realizado en 55 aislados de *C. difficile*, que incluían cepas resistentes a quinolonas y CMI's elevadas frente a vancomicina y metronidazol [407]. El papel que este nuevo fármaco puede tener en el tratamiento de la ICD requiere de más datos clínicos.

Tigeciclina fue también muy activa frente a las cepas de este estudio. Los otros agentes antimicrobianos que se probaron presentaron una actividad variable. Como cabía esperar, el fenotipo de resistencia más frecuente se dio en clindamicina y moxifloxacino. Se han observado resultados similares en otros estudios europeos y estadounidenses [61, 481].

En nuestro estudio observamos que el ribotipo más común fue el 001 con un porcentaje de un 35,0% de todas las cepas, siendo el porcentaje de resistencia a clindamicina, moxifloxacino y rifaximina, respectivamente, 55,1%, 49,6%, y 32,2%. De manera similar, en un estudio multicéntrico europeo, el ribotipo 001, tuvo uno de los porcentajes más elevados de resistencia a 3 o más familias de antibióticos [482].

CONCLUSIONES

1. Nuestros datos demuestran que parte de la solución del infradiagnóstico, es que los laboratorios deberían realizar de forma rutinaria las pruebas de detección de ICD en todas las muestras de heces diarreicas de pacientes mayores de 2 años.
2. Nuestro trabajo demuestra que parte de los casos de ICD comunitario son reclasificados en relacionados con la asistencia sanitaria tras una evaluación de su grado de exposición al mismo. Este concepto debería incorporarse en las definiciones de las guías de práctica clínica.
3. El concepto de “mala evolución” creado en nuestro trabajo, permite agrupar a pacientes que empeoran en el curso del proceso, que no responden a tratamiento o que recurren una o varias veces. Consideramos este concepto más práctico que el de recurrencia a la hora de la elección terapéutica.
4. Nuestro estudio ha tropezado con las mismas limitaciones que algunos estudios previos a la hora de obtener una regla de predicción de mala evolución en base a datos clínicos presentes en el comienzo del cuadro. Sin embargo, hemos podido demostrar la mejora de los factores de predicción al incorporar datos microbiológicos disponibles en poco tiempo.
5. En un entorno sin presencia de ribotipo 027, no es necesario tener consideraciones distintas para el manejo clínico del paciente en función de los distintos ribotipos no-027 ya que no se ha demostrado ninguna asociación entre las características

genotípicas (incluyendo la presencia de toxina binaria) y la evolución de los pacientes con distintas cepas de ribotipo no-027.

6. Nuestro estudio molecular ha permitido refrendar la definición de recurrencia utilizada por nosotros y posteriormente adoptada por el ESCMID. La mayoría (76,7%) de las recurrencias son causadas por la misma cepa del episodio inicial.
7. Las cepas circulantes en nuestro entorno pueden ser tratadas con los antibióticos clásicos como vancomicina metronidazol y los de reciente aparición, fidaxomicina y surotomicina, al no encontrarse ninguna resistencia antibiótica de los mismos en nuestro estudio de sensibilidad. Por el contrario, rifaximina no debe considerarse como tratamiento alternativo en nuestro entorno dada la elevada resistencia encontrada en nuestro estudio.

CONCLUSIONS

1. Our data demonstrates that part of the solution of the underdiagnosis of CDI is that laboratories should routinely perform screening of CDI in all diarrheic stool samples of patients over two years of age.
2. Our work shows that community CDI cases are reclassified in healthcare related cases following an assessment of their level of exposure to the healthcare system. This concept should be incorporated in the clinical practice guidelines definitions.
3. The concept of "poor outcome" created in our study, allows grouping patients who worsen during the process, who do not respond to treatment or who recur one or more times. We consider this a more practical concept than recurrence for therapeutic decision choices.
4. Our study has faced the same limitations, as some previous studies, when it comes to obtaining a prediction rule for poor outcome based on clinical data present at the time of the diagnosis. However, we have demonstrated the improvement of the prediction rule when microbiological data shortly available are incorporated.
5. In a non ribotype 027 setting, it is not necessary to have different considerations in the clinical management of the patient based on the different non- 027 ribotypes since we have shown that there is no association between genotypic characteristics (including the presence of toxin binary) and the evolution of patients regarding different strains of non-ribotype 027.

6. Our molecular study has endorsed the recurrence definition used by us and subsequently adopted by the ESCMID. Most (76.7%) recurrences are caused by the same strain of the initial episode.

7. *C. difficile* strains circulating in our environment can be treated with traditional antibiotics such as metronidazole and vancomycin as well as with the novel antibiotics, fidaxomicin and surotomycin, since we did not find any antibiotic resistance in our antimicrobial susceptibility studies. In contrast, rifaximin should not be considered as an alternative treatment in our environment given the high resistance encountered in our study.

ANEXO 1. Protocolo Clínico y Epidemiológico

A. DATOS DEMOGRAFICOS

1 Código de identificación:

2 Fecha de nacimiento: ____/____/____

3 Sexo (0: varón; 1: mujer): ☐

4 Número de historia clínica:

5 Paciente ingresado (0: No; 1: Sí): ☐

6. Servicio de ingreso : _____

7. Tipo de servicio de ingreso: ☐

(0: Médico; 1: oncológico; 2: quirúrgico; 3: cuidados intensivos adultos; 4: reanimación; 5: pediatría; 6: neonatología; 7: cuidados intensivos pediatría o neonatología)

8. Fecha de ingreso hospitalización: ____/____/____

9. Fecha de alta o de exitus: ____/____/____

10. Días Estancia Hospitalaria:

11. Tipo de Episodio: ☐

(1: HO-HCFA; 2 CO-HCFA; 3 Indeterminado 4 CA-CDI)

HO-HCFA: >48h ingresado*; CO-HCFA: < 4 semanas desde alta; Indeterminado :4-12 semanas desde alta; CA-CDI: > 12 semanas desde alta. *Si < 48 horas ingreso valorar si CO-HCFA, Indeterminado o CA-CDI.

12. N° MICRO: _____ Fecha Muestra: ____/____/____

13. Es Episodio Recurrencia (0: No; 1: Sí): ☐

B. DATOS CLINICOS

SITUACIÓN BASAL

• Enfermedad de base fundamental :

Ninguna	1	Respiratoria	6	Metabólica	11	Psíquica	16
VIH	2	Gastrointestinal	7	Infecciosa	12	Ocular	17
Trasplante	3	Hígado-Páncreas	8	Alérgica	13	Cutánea	18
Neoplasia	4	Hematológica	9	Reumatológica	14	Nefro-urológica	19
Cardiovascular	5	Endocrina	10	Neurológica	15	Inmunológica	21
						Otras	20

• Enfermedad de Base Clasificación de McCabe y Jackson:

(1:Rapidamente mortal[muerte<2meses]; 2 Últimamente mortal[muerte<4años]; 3: No fatal)

- Índice ponderado de co-morbilidad (Charlson):

Asigne 1 punto por cada uno	Sí	No	Asigne 2 puntos por cada uno	Sí	No
Infarto de miocardio			Hemiplejía		
Insuficiencia cardíaca congestiva			Nefropatía moderada/ grave		
Enfermedad vascular periférica			Diabetes con repercusión orgánica		
Enfermedad cerebrovascular			Cualquier tumor		
Demencia			Leucemia		
Enfermedad pulmonar crónica			Linfoma		
Colagenosis					
Enfermedad ulcerosa					
Hepatopatía leve					
Diabetes					
Asigne 3 puntos por cada uno	Sí	No	Asigne 6 puntos por cada uno	Sí	No
Hepatopatía moderada/ grave			Tumor metastásico		
			SIDA		

- Episodios previos ICD (0 NO:1Sí):
- N° Episodios previos:
- Tratamiento antibiótico mes previo (0: NO; 1: SÍ):
- Número AB:

	Nombre	Fecha inicio	Fecha fin
Fármaco 1			
Fármaco 2			
Fármaco 3			
Fármaco 4			
Fármaco 5			
Fármaco 6			

- Uso de Inhibidores Bomba de Protones mes previo (0: NO; 1: SÍ):
- Sonda nasogástrica mes previo(0: NO; 1: SÍ):
- Ventilación mecánica mes previo(0: NO; 1: SÍ):
- Enfermedad Inflamatoria Intestinal (0: NO; 1: SÍ):
- Cirugía en este ingreso (0: NO; 1: SÍ):

- Tipo de cirugía _____

- SAMR(0: NO; 1: Sí): ☐

- Quimioterapia(0 No, 1 Sí): ☐

- Diálisis(0 No, 1 Sí): ☐

- Ingresos Previos G-I (0 No, 1 Sí): ☐

DATOS SOBRE EL EPISODIO DE DIARREA

- Días Diarrea (Comienzo síntomas hasta fin episodio): ☐

- Dolor abdominal (0 No, 1 Sí): ☐

- Distensión abdominal (0 No, 1 Sí): ☐

- Megacolon tóxico (0 No, 1 Sí): ☐

- Colitis pseudomembranosa (0 No, 1 Sí , 2 No se sabe): ☐

Leucos	Hb	Plaquetas	Albumina	Creat	GOT/GPT	Tensión	Urea Pre	Urea Pos	Linfos Pre	Linfos Pos

- Gravedad episodio: ☐

(0-Asintomático;1-Diarrea leve;2-Diarrea grave;3-Diarrea grave complicada)

***GRAVE:** Recuento de Leucocitos $\geq 15,000/\mu\text{l}$ o Incremento de Creatinina > 50% nivel basal

***GRAVE COMPLICADA:** Hipotensión/ sépsis o Íleo paralítico o Megacolon tóxico o Perforación intestinal o Requiere admisión en UCI o Requiere cirugía debido a la ICD.

- Índice HINES VA: ☐

Índice ZAR : ☐

Asigne 1 punto por cada uno:	Sí	No
Íleo		
$T^a > 38^\circ\text{C}$		
Presión sistólica <100mmHg		
Leucocitos ≥ 15.000 - <30.000cel/mm ³		
1 Hallazgo en el TAC*		
Asigne 2 punto por cada uno:		
Leucocitos ≥ 30.000 cel/mm ³		
≥ 2 Hallazgos TAC*		

*Hallazgos TAC: Engrosamiento pared colon. Dilatación colon, Ascitis

Asigne 1 punto por cada uno:	Sí	No
Edad >60		
$T^a > 38.3^\circ\text{C}$		
Albumina <2,5mg/dl		
Leucocitos >15.000cel/mm ³		
Asigne 2 punto por cada uno:		
Colitis Pseudomembranosa		
Tratamiento en UCI		

F. TRATAMIENTO del episodio ICD o USO Metronidazol (vo/iv) o Vancomicina (vo) en Controles

- Ha recibido tratamiento antiostridium? ☐

	Nombre	Fecha inicio	Fecha fin	Vía administración
Tratamiento 1				
Tratamiento 2				
Tratamiento 3				

- Ha precisado Cirugía por Episodio ICD? (0No;1 Sí): ☐

- Especificar cirugía: _____

F. EVOLUCIÓN

- Necesidad de ingreso en UCI: (0No;1 Sí): ☐
 - Fecha de entrada en la UCI : ____/____/____
 - Fecha de alta de UCI: ____/____/____
 - Días Estancia UCI: ☐
 - Evolución al ALTA UCI (0 Muerte; 1 Curación; 2 Mejoría): ☐
- Evolución al ALTA Ingreso (0 Muerte; 1 Curación; 2 Mejoría): ☐
 - Si muerte: Fecha Exitus: ____/____/____
- Sólo rellenar en los Casos (Controles No):

- Muerte relacionada con *C. difficile*: ☐

(0 No Relacionada; 1 Posiblemente Relacionada; 2 Claramente Relacionada)

***No relacionada:** Muerte durante ingreso que ocurre tras curación clínica ICD y/o atribuida por otras causas.

***Posiblemente relacionada:** No cumple criterios de No relacionada ni de Claramente relacionada (ocurren de manera concomitante otras causas atribuibles de muerte e infección activa por *C. difficile*).

***Claramente relacionada:** No hay otra causa atribuible de muerte salvo enfermedad activa por *C. difficile*.

- Fracaso Terapéutico (0No;1 Sí): ☐ Fecha
- Recurrencia (0No;1 Sí): ☐ Fecha:
- N° Recurrencias: ☐

DATOS SOBRE EL EPISODIO DE RECURRENCIA

- Días Diarrea (Comienzo síntomas hasta fin episodio): ☐
- Dolor abdominal (0 No, 1 Sí): ☐
- Distensión abdominal (0 No, 1 Sí): ☐

- Megacolon tóxico (0 No, 1 Sí):

- Colitis pseudomembranosa (0 No, 1 Sí, 2 No se sabe):

Leucos	Hb	Plaquetas	Albumina	Creatinina	GOT/GPT	Tensión	Urea	Linfos

- Gravedad episodio:

(0-Asintomático;1-Diarrea leve;2-Diarrea grave;3-Diarrea grave complicada)

***GRAVE:** Recuento de Leucocitos $\geq 15,000/\mu\text{l}$ o Incremento de Creatinina $> 50\%$ nivel basal

***GRAVE COMPLICADA:** Hipotensión/ sépsis o Íleo paralítico o Megacolon tóxico o Perforación intestinal o Requiere admisión en UCI o Requiere cirugía debido a la ICD.

- Índice HINES VA:

Índice ZAR :

Asigne 1 punto por cada uno:	Sí	No
Íleo		
$T^a > 38^\circ\text{C}$		
Presión sistólica $< 100\text{mmHg}$		
Leucocitos $\geq 15.000 - < 30.000\text{cel}/\text{mm}^3$		
1 Hallazgo en el TAC*		
Asigne 2 punto por cada uno:		
Leucocitos $\geq 30.000\text{cel}/\text{mm}^3$		
≥ 2 Hallazgos TAC*		

Asigne 1 punto por cada uno:	Sí	No
Edad > 60		
$T^a > 38.3^\circ\text{C}$		
Albumina $< 2,5\text{mg/dl}$		
Leucocitos $> 15.000\text{cel}/\text{mm}^3$		
Asigne 2 punto por cada uno:		
Colitis Pseudomembranosa		
Tratamiento en UCI		

*Hallazgos TAC: Engrosamiento pared colon. Dilatación colon, Ascitis

TRATAMIENTO del Recurrencia ICD o USO Metronidazol (vo/iv) o Vancomicina (vo)

- Ha recibido tratamiento antiostridium?

	Nombre	Fecha inicio	Fecha fin	Vía administración
Tratamiento 1				
Tratamiento 2				
Tratamiento 3				

- Ha precisado Cirugía por Episodio ICD? (0No;1 Sí):

- Especificar cirugía: _____

EVOLUCIÓN Recurrencia

- Necesidad de ingreso en UCI: (0No;1 Sí):
 - Fecha de entrada en la UCI : ____/____/____
 - Fecha de alta de UCI: ____/____/____
 - Días Estancia UCI:

- Evolución al ALTA UCI (0 Muerte; 1 Curación; 2 Mejoría):
- Evolución al ALTA Ingreso (0 Muerte; 1 Curación; 2 Mejoría):
 - Si muerte: Fecha Exitus: ____/____/____
- Sólo rellenar en los Casos (Controles No):
 - Muerte relacionada con *C. difficile*:
(0 No Relacionada 1 Relacionada)

COMENTARIOS:

BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH, (2010) Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 31: 431-455
2. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH, (2010) The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical microbiology reviews* 23: 529-549
3. Johnson S, (2012) Meeting the challenge of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Journal of hospital medicine : an official publication of the Society of Hospital Medicine* 7 Suppl 3: S11-13
4. Redelings MD, Sorvillo F, Mascola L, (2007) Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerging infectious diseases* 13: 1417-1419
5. Bartlett JG, (2010) *Clostridium difficile*: progress and challenges. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1213: 62-69
6. Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R, Brassard P, Dendukuri N, Beliveau C, Oughton M, Brukner I, Dascal A, (2011) Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *The New England journal of medicine* 365: 1693-1703
7. Anand A, Bashey B, Mir T, Glatt AE, (1994) Epidemiology, clinical manifestations, and outcome of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *The American journal of gastroenterology* 89: 519-523
8. Hurley BW, Nguyen CC, (2002) The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Archives of internal medicine* 162: 2177-2184
9. Kelly CP, LaMont JT, (1998) *Clostridium difficile* infection. *Annual review of medicine* 49: 375-390
10. Surawicz CM, (2009) Reining in recurrent *Clostridium difficile* infection--who's at risk? *Gastroenterology* 136: 1152-1154
11. Marts BC, Longo WE, Vernava AM, 3rd, Kennedy DJ, Daniel GL, Jones I, (1994) Patterns and prognosis of *Clostridium difficile* colitis. *Diseases of the colon and rectum* 37: 837-845
12. Vardakas KZ, Polyzos KA, Patouni K, Rafailidis PI, Samonis G, Falagas ME, (2012) Treatment failure and recurrence of *Clostridium difficile* infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence. *International journal of antimicrobial agents* 40: 1-8
13. Fekety R, McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Mulligan ME, (1997) Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 24: 324-333
14. Oka K, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Okazaki M, Manzoku T, Takahashi M, Tanaka M, Taguchi H, Watanabe T, Inamatsu T, Kamiya S, (2012) Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases. *Journal of clinical microbiology* 50: 915-921
15. Bacon AE, 3rd, Fekety R, (1994) Immunoglobulin G directed against toxins A and B of *Clostridium difficile* in the general population and patients with

- antibiotic-associated diarrhea. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 18: 205-209
16. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP, (2001) Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 357: 189-193
 17. Ananthakrishnan AN, (2011) *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 8: 17-26
 18. McGlone SM, Bailey RR, Zimmer SM, Popovich MJ, Tian Y, Ufberg P, Muder RR, Lee BY, (2012) The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18: 282-289
 19. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP, (1978) *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1: 1063-1066
 20. Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, Suetens C, Drudy D, Wiuff C, Pituch H, Reichert P, Schneider F, Widmer AF, Olsen KE, Allerberger F, Notermans DW, Barbut F, Delmee M, Wilcox M, Pearson A, Patel BC, Brown DJ, Frei R, Akerlund T, Poxton IR, Tull P, (2007) Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 12: E1-2
 21. Gerding DN, Johnson S, (2013) Does infection with specific *Clostridium difficile* strains or clades influence clinical outcome? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 56: 1601-1603
 22. Institute CaLS (2007) *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard M117A7* Wayne, PA
 23. Persson S, Torpdahl M, Olsen KE, (2008) New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect* 14: 1057-1064
 24. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF, Pons JL, (2004) Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology* 42: 5710-5714
 25. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI, (1999) PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *Journal of clinical microbiology* 37: 461-463
 26. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P, (2006) Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12 Suppl 6: 2-18
 27. Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, Winston LG, Bamberg WM, Lyons C, Farley MM, Dumyati GK, Wilson LE, Beldavs ZG, Dunn JR, Gould LH, MacCannell DR, Gerding DN, McDonald LC, Lessa FC, (2013) Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. *JAMA internal medicine* 173: 1359-1367
 28. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB, (2006) *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerging infectious diseases* 12: 409-415

29. Gravel D, Miller M, Simor A, Taylor G, Gardam M, McGeer A, Hutchinson J, Moore D, Kelly S, Boyd D, Mulvey M, (2009) Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48: 568-576
30. Gerding DN, (2010) Global epidemiology of *Clostridium difficile* infection in 2010. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 31 Suppl 1: S32-34
31. Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH, (2008) Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005. *Emerg Infect Dis* 14: 929-931
32. Ricciardi R, Rothenberger DA, Madoff RD, Baxter NN, (2007) Increasing prevalence and severity of *Clostridium difficile* colitis in hospitalized patients in the United States. *Arch Surg* 142: 624-631; discussion 631
33. (2013) Quarterly Analyses: Mandatory MRSA, MSSA and *E. coli* Bacteraemia and CDI in England (up to April-June 2013). London: Public Health England
34. Lucado J, Gould C, Elixhauser A, (2006) *Clostridium Difficile* Infections (CDI) in Hospital Stays, 2009: Statistical Brief #124
35. Cole A, (2013) MRSA and *C. difficile* deaths continue to fall in England and Wales. *BMJ (Clinical research ed)* 347: f5278
36. Kochanek K, (2011) Deaths: Final Data for 2009 National Vital Statistics Reports 60
37. Mermel LA, Jefferson J, Blanchard K, Parenteau S, Mathis B, Chapin K, Machan JT, (2013) Reducing *Clostridium difficile* incidence, colectomies, and mortality in the hospital setting: a successful multidisciplinary approach. *Joint Commission journal on quality and patient safety / Joint Commission Resources* 39: 298-305
38. Lavergne V, Beausejour Y, Pichette G, Ghannoum M, Su SH, (2013) Lymphopenia as a novel marker of *Clostridium difficile* infection recurrence. *The Journal of infection* 66: 129-135
39. Fujitani S, George WL, Murthy AR, (2011) Comparison of clinical severity score indices for *Clostridium difficile* infection. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 32: 220-228
40. Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS, (2009) Clinical risk factors for severe *Clostridium difficile*-associated disease. *Emerg Infect Dis* 15: 415-422
41. Olson MM, Shanholtzer CJ, Lee JT, Jr., Gerding DN, (1994) Ten years of prospective *Clostridium difficile*-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA Medical Center, 1982-1991. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 15: 371-381
42. Miller MA, Hyland M, Ofner-Agostini M, Gourdeau M, Ishak M, (2002) Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 23: 137-140
43. Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP, (2002) Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 34: 346-353

44. Johnson S, (2009) Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *The Journal of infection* 58: 403-410
45. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper EJ, (2011) *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 377: 63-73
46. Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL, (2008) Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *The Journal of hospital infection* 70: 298-304
47. Kelly CP, (2012) Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 Suppl 6: 21-27
48. Hu MY, Katchar K, Kyne L, Maroo S, Tummala S, Dreisbach V, Xu H, Leffler DA, Kelly CP, (2009) Prospective derivation and validation of a clinical prediction rule for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology* 136: 1206-1214
49. Abou Chakra CN, Pepin J, Valiquette L, (2012) Prediction tools for unfavourable outcomes in *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *PloS one* 7: e30258
50. (2005) Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 54: 1201-1205
51. Bauer MP, Goorhuis A, Koster T, Numan-Ruberg SC, Hagen EC, Debast SB, Kuijper EJ, van Dissel JT, (2008) Community-onset *Clostridium difficile*-associated diarrhoea not associated with antibiotic usage--two case reports with review of the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *The Netherlands journal of medicine* 66: 207-211
52. Leffler DA, Lamont JT, (2012) Editorial: not so nosocomial anymore: the growing threat of community-acquired *Clostridium difficile*. *The American journal of gastroenterology* 107: 96-98
53. Hirschhorn LR, Trnka Y, Onderdonk A, Lee ML, Platt R, (1994) Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *The Journal of infectious diseases* 169: 127-133
54. Levy DG, Stergachis A, McFarland LV, Van Vorst K, Graham DJ, Johnson ES, Park BJ, Shatin D, Clouse JC, Elmer GW, (2000) Antibiotics and *Clostridium difficile* diarrhea in the ambulatory care setting. *Clinical therapeutics* 22: 91-102
55. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL, Harmsen WS, Zinsmeister AR, (2012) The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *The American journal of gastroenterology* 107: 89-95
56. Karlstrom O, Fryklund B, Tullus K, Burman LG, (1998) A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Sweden. The Swedish C. *difficile* Study Group. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 26: 141-145
57. Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN, (2008) A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 62: 388-396
58. Noren T, Akerlund T, Back E, Sjoberg L, Persson I, Alriksson I, Burman LG, (2004) Molecular epidemiology of hospital-associated and community-acquired *Clostridium difficile* infection in a Swedish county. *Journal of clinical microbiology* 42: 3635-3643

59. McFarland LV, Clarridge JE, Beneda HW, Raugi GJ, (2007) Fluoroquinolone use and risk factors for *Clostridium difficile*-associated disease within a Veterans Administration health care system. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45: 1141-1151
60. Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S, (2005) Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 294: 2989-2995
61. Alcala L, Martin A, Marin M, Sanchez-Somolinos M, Catalan P, Pelaez T, Bouza E, (2012) The undiagnosed cases of *Clostridium difficile* infection in a whole nation: where is the problem? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18: E204-213
62. Asensio A, Bouza E, Grau S, Rubio-Rodriguez D, Rubio-Terres C, (2013) [Cost of *Clostridium difficile* associated diarrhea in Spain]. *Revista española de salud publica* 87: 25-33
63. Rubin MS, Bodenstein LE, Kent KC, (1995) Severe *Clostridium difficile* colitis. *Diseases of the colon and rectum* 38: 350-354
64. Welfare MR, Lalayiannis LC, Martin KE, Corbett S, Marshall B, Sarma JB, (2011) Co-morbidities as predictors of mortality in *Clostridium difficile* infection and derivation of the ARC predictive score. *The Journal of hospital infection* 79: 359-363
65. Zilberberg MD, Shorr AF, Micek ST, Doherty JA, Kollef MH, (2009) *Clostridium difficile*-associated disease and mortality among the elderly critically ill. *Critical care medicine* 37: 2583-2589
66. Bhangu S, Bhangu A, Nightingale P, Michael A, (2010) Mortality and risk stratification in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Colorectal Dis* 12: 241-246
67. Miller MA, Louie T, Mullane K, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Kean Y, Sears P, (2013) Derivation and validation of a simple clinical bedside score (ATLAS) for *Clostridium difficile* infection which predicts response to therapy. *BMC infectious diseases* 13: 148
68. Eyre DW, Walker AS, Wyllie D, Dingle KE, Griffiths D, Finney J, O'Connor L, Vaughan A, Crook DW, Wilcox MH, Peto TE, (2012) Predictors of first recurrence of *Clostridium difficile* infection: implications for initial management. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 Suppl 2: S77-87
69. Deshpande A, Pant C, Pasupuleti V, Rolston DD, Jain A, Deshpande N, Thota P, Sferra TJ, Hernandez AV, (2012) Association between proton pump inhibitor therapy and *Clostridium difficile* infection in a meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10: 225-233
70. Kim YG, Graham DY, Jang BI, (2012) Proton pump inhibitor use and recurrent *Clostridium difficile*-associated disease: a case-control analysis matched by propensity score. *Journal of clinical gastroenterology* 46: 397-400
71. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP, (2000) Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *The New England journal of medicine* 342: 390-397
72. Katchar K, Taylor CP, Tummala S, Chen X, Sheikh J, Kelly CP, (2007) Association between IgG2 and IgG3 subclass responses to toxin A and recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5: 707-713

73. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT, (1994) *Clostridium difficile* colitis. The New England journal of medicine 330: 257-262
74. Voth DE, Ballard JD, (2005) *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clinical microbiology reviews 18: 247-263
75. Moore P, Kyne L, Martin A, Solomon K, (2013) Germination efficiency of clinical *Clostridium difficile* spores and correlation with ribotype, disease severity and therapy failure. Journal of medical microbiology 62: 1405-1413
76. Burns DA, Heeg D, Cartman ST, Minton NP, (2011) Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent *Clostridium difficile* BI/NAP1/027. PloS one 6: e24894
77. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH, (2007) *tcdC* genotypes associated with severe *TcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 45: 215-221
78. Pultz NJ, Donskey CJ, (2005) Effect of antibiotic treatment on growth of and toxin production by *Clostridium difficile* in the cecal contents of mice. Antimicrobial agents and chemotherapy 49: 3529-3532
79. Leslie JL, Cohen SH, Solnick JV, Polage CR, (2012) Role of fecal *Clostridium difficile* load in discrepancies between toxin tests and PCR: is quantitation the next step in *C. difficile* testing? European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31: 3295-3299
80. Lungulescu OA, Cao W, Gatskevich E, Tlhabano L, Stratidis JG, (2011) CSI: a severity index for *Clostridium difficile* infection at the time of admission. The Journal of hospital infection 79: 151-154
81. Drew RJ, Boyle B, (2009) RUWA scoring system: a novel predictive tool for the identification of patients at high risk for complications from *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 71: 93-94; author reply 94-95
82. Hensgens MP, Dekkers OM, Goorhuis A, Lecessie S, Kuijper EJ, (2013) Predicting a complicated course of *Clostridium difficile* infection at the bedside. Clin Microbiol Infect
83. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P, (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun 56: 2299-2306
84. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M, (2000) Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS microbiology letters 186: 307-312
85. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC, (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 366: 1079-1084
86. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN, (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. The New England journal of medicine 353: 2433-2441
87. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault AM, Nguyen T, Frenette C, Kelly M, Vibien A, Brassard P, Fenn S, Dewar K, Hudson TJ, Horn R, Rene P, Monczak Y, Dascal A, (2005) A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. The New England journal of medicine 353: 2442-2449

88. Barbut F, Gariazzo B, Bonne L, Lalande V, Burghoffer B, Luiuz R, Petit JC, (2007) Clinical features of *Clostridium difficile*-associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000-2004. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28: 131-139
89. Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I, (2007) Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13: 1048-1057
90. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Dekker FW, Kuijper EJ, (2008) Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47: 1162-1170
91. Walk ST, Micic D, Jain R, Lo ES, Trivedi I, Liu EW, Almassalha LM, Ewing SA, Ring C, Galecki AT, Rogers MA, Washer L, Newton DW, Malani PN, Young VB, Aronoff DM, (2012) *Clostridium difficile* ribotype does not predict severe infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55: 1661-1668
92. Sirard S, Valiquette L, Fortier LC, (2011) Lack of association between clinical outcome of *Clostridium difficile* infections, strain type, and virulence-associated phenotypes. *Journal of clinical microbiology* 49: 4040-4046
93. Barbut F, Decre D, Lalande V, Burghoffer B, Noussair L, Gigandon A, Espinasse F, Raskine L, Robert J, Mangeol A, Branger C, Petit JC, (2005) Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *Journal of medical microbiology* 54: 181-185
94. Kim J, Seo MR, Kang JO, Choi TY, Pai H, (2013) Clinical and Microbiologic Characteristics of *Clostridium difficile* Infection Caused by Binary Toxin Producing Strain in Korea. *Infection & chemotherapy* 45: 175-183
95. Stewart DB, Berg A, Hegarty J, (2013) Predicting recurrence of *C. difficile* colitis using bacterial virulence factors: binary toxin is the key. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 17: 118-124; discussion p 124-115
96. Goldenberg SD, French GL, (2011) Lack of association of *tcdC* type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*. *The Journal of infection* 62: 355-362
97. Bacci S, Molbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE, (2011) Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerging infectious diseases* 17: 976-982
98. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB, (1978) Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *The New England journal of medicine* 298: 531-534
99. Snyder ML, (1937) Further studies on *Bacillus difficilis* (Hall and O'Toole). *Journal of Infectious Diseases* 60: 223-231
100. Smith L.D.S KEO, (1962) Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. *Journal of bacteriology* 84: 65-67
101. Finney JMT, (1893) Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bull Johns Hopkins Hosp* 4: 53-55
102. Bartlett JG, (1994) *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis* 18 Suppl 4: S265-272.

103. Thielman NM, Antibiotic- Associated Colitis
104. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH, (1974) Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Annals of internal medicine* 81: 429-433
105. Bartlett JG, Chang TW, Onderdonk AB, (1978) Comparison of five regimens for treatment of experimental clindamycin-associated colitis. *The Journal of infectious diseases* 138: 81-86
106. Taylor NS, Bartlett JG, (1979) Partial purification and characterization of a cytotoxin from *Clostridium difficile*. *Reviews of infectious diseases* 1: 379-385
107. Yolken RH, Whitcomb LS, Marien G, Bartlett JD, Libby J, Ehrich M, Wilkins T, (1981) Enzyme immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* antigen. *The Journal of infectious diseases* 144: 378
108. Laughon BE, Viscidi RP, Gdovin SL, Yolken RH, Bartlett JG, (1984) Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. *The Journal of infectious diseases* 149: 781-788
109. Jones AM, Kuijper EJ, Wilcox MH, (2013) *Clostridium difficile*: a European perspective. *The Journal of infection* 66: 115-128
110. Pepin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S, Leblanc M, Rivard G, Bettez M, Primeau V, Nguyen M, Jacob CE, Lanthier L, (2005) Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41: 1254-1260
111. Allan SD, Emery, C.L., Siders J.A. (1999) *Clostridium*. In: Murray PR (ed) *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, pp. 655-660
112. Wilson KH, (1993) The microecology of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 16 Suppl 4: S214-218.
113. Borriello SP, (1998) Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 41 Suppl C: 13-19
114. Pituch H, Obuch-Woszczatynski P, van den Braak N, van Belkum A, Kujawa M, Luczak M, Meisel-Mikolajczyk F, (2002 Mar) Variable flagella expression among clonal toxin A-/B+*Clostridium difficile* strains with highly homogeneous flagellin genes. *Clin Microbiol Infect* 8: 187-188.
115. Waligora AJ, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T, (2001 Apr) Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun* 69: 2144-2153.
116. Waligora AJ, Barc MC, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T, (1999) *Clostridium difficile* cell attachment is modified by environmental factors. *Applied and environmental microbiology* 65: 4234-4238
117. Fry DE, *Clostridium difficile* infection. *Pharmanual: Emerging Pathogens: Implications for the Future*: 51-75
118. Alfa MJ, Kabani A, Lysterly D, Moncrief S, Neville LM, Al-Barrak A, Harding GK, Dyck B, Olekson K, Embil JM, (2000 Jul) Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38: 2706-2714.
119. Moncrief JS, Zheng L, Neville LM, Lysterly DM, (2000 Aug) Genetic characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 38: 3072-3075.

120. Rupnik M, Kato N, Grabnar M, Kato H, (2003 Mar) New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J Clin Microbiol* 41: 1118-1125.
121. Mathis JN, Pilkinton L, McMillin DE, (1999) Detection and transcription of toxin DNA in a nontoxigenic strain of *Clostridium difficile*. *Current microbiology* 38: 324-328
122. Karlsson S, Dupuy B, Mukherjee K, Norin E, Burman LG, Akerlund T, (2003 Apr) Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. *Infect Immun* 71: 1784-1793.
123. Tan KS, Wee BY, Song KP, (2001 Jul) Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 50: 613-619.
124. Mukherjee K, Karlsson S, Burman LG, Akerlund T, (2002 Jul) Proteins released during high toxin production in *Clostridium difficile*. *Microbiology* 148: 2245-2253.
125. Cohen SH, Tang YJ, Silva J, Jr., (2000 Feb) Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J Infect Dis* 181: 659-663.
126. Spigaglia P, Mastrantonio P, (2002 Sep) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 40: 3470-3475.
127. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G, (2001 Aug) The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 7: 421-427.
128. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB, (2001 Feb 26) *Clostridium difficile*--Associated diarrhea: A review. *Arch Intern Med* 161: 525-533.
129. Fekety R, (1997) Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *The American journal of gastroenterology* 92: 739-750
130. Eglow R, Pothoulakis C, Itzkowitz S, Israel EJ, CJ OK, Gong D, Gao N, Xu YL, Walker WA, LaMont JT, (1992) Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest* 90: 822-829.
131. Savidge TC, Pan WH, Newman P, M Ob, Anton PM, Pothoulakis C, (2003 Aug) *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* 125: 413-420.
132. Borriello SP, Davies HA, Kamiya S, Reed PJ, Seddon S, (1990) Virulence factors of *Clostridium difficile*. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 2: S185-191.
133. Qa'Dan M, Spyres LM, Ballard JD, (2000 May) pH-induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B. *Infect Immun* 68: 2470-2474.
134. Rolfe RD, Song W, (1993) Purification of a functional receptor for *Clostridium difficile* toxin A from intestinal brush border membranes of infant hamsters. *Clin Infect Dis* 16 Suppl 4: S219-227.
135. Borriello SP, Wren BW, Hyde S, Seddon SV, Sibbons P, Krishna MM, Tabaqchali S, Manek S, Price AB, (1992) Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infection and immunity* 60: 4192-4199
136. Depitre C, Delmee M, Avesani V, L'Haridon R, Roels A, Popoff M, Corthier G, (1993) Serogroup F strains of *Clostridium difficile* produce toxin B but not toxin A. *Journal of medical microbiology* 38: 434-441
137. Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, Suzuki K, Kim SM, Chong Y, Wasito EB, (1998) Identification of toxin A-negative, toxin

- B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *Journal of clinical microbiology* 36: 2178-2182
138. Song KP, Ow SE, Chang SY, Bai XL, (1999) Sequence analysis of a new open reading frame located in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864. *FEMS microbiology letters* 180: 241-248
 139. Pituch H, van den Braak N, van Leeuwen W, van Belkum A, Martirosian G, Obuch-Woszczatynski P, Luczak M, Meisel-Mikolajczyk F, (2001 Aug) Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. *Clin Microbiol Infect* 7: 442-446.
 140. Kato H KN, Fukui K, Ohora A & Watanabe K., (1997) High prevalence of toxin A-negative/toxin B-positive *clostridium difficile* strains among adult inpatients. *Clinical Microbiology and Infection* 3, Suppl.2: 220
 141. Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Thien HV, Grimprel E, Petit JC, (2002 Jun) Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. *J Clin Microbiol* 40: 2079-2083.
 142. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, Delmee M, Avesani V, Merrigan MM, Gerding DN, (2003 Apr) International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J Clin Microbiol* 41: 1543-1547.
 143. Rupnik M, Avesani V, Janc M, von Eichel-Streiber C, Delmee M, (1998) A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *Journal of clinical microbiology* 36: 2240-2247
 144. Rupnik M, Brazier JS, Duerden BI, Grabnar M, Stubbs SL, (2001 Feb) Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology* 147: 439-447.
 145. Rupnik M, Braun V, Soehn F, Janc M, Hofstetter M, Laufenberg-Feldmann R, von Eichel-Streiber C, (1997) Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. *FEMS microbiology letters* 148: 197-202
 146. Blake JE, Mitsikosta F, Metcalfe MA, (2004 Mar) Immunological detection and cytotoxic properties of toxins from toxin A-positive, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J Med Microbiol* 53: 197-205.
 147. Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR, (1997) Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infection and immunity* 65: 1402-1407
 148. Geric B, Johnson S, Gerding DN, Grabnar M, Rupnik M, (2003 Nov) Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins. *J Clin Microbiol* 41: 5227-5232.
 149. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M, (2000 May 15) Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *Fems Microbiol Lett* 186: 307-312.
 150. Gulke I, Pfeifer G, Liese J, Fritz M, Hofmann F, Aktories K, Barth H, (2001 Oct) Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 69: 6004-6011.
 151. Goncalves C, Decre D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC, (2004) Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology* 42: 1933-1939
 152. (!!! INVALID CITATION !!!)

153. Bartlett JG, (1992) Antibiotic-associated diarrhea. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 15: 573-581
154. Kelly CP, LaMont JT, (2008) Clostridium difficile--more difficult than ever. The New England journal of medicine 359: 1932-1940
155. Miller BA, Chen LF, Sexton DJ, Anderson DJ, (2011) Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated Clostridium difficile Infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus in community hospitals. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 32: 387-390
156. Lucado J, Gould C, Elixhauser A (2006) Clostridium Difficile Infections (CDI) in Hospital Stays, 2009: Statistical Brief #124 Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs, Rockville MD
157. J. Lucado CG, A. Elixhauser (2012) Clostridium difficile infections (CDI) in hospital stays. Healthcare Cost and Utilization Project. . Agency for Healthcare Research and Quality Statistical brief #124
158. VerLee KE, Finks JL, Wilkins MJ, Wells EV, (2012) Michigan Clostridium difficile hospital discharges: frequency, mortality, and charges, 2002-2008. Public health reports (Washington, DC : 1974) 127: 62-71
159. Gouliouris T, Brown NM, Aliyu SH, (2011) Prevention and treatment of Clostridium difficile infection. Clinical medicine (London, England) 11: 75-79
160. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, Roberts T, Croyle K, Krystofiak S, Patel-Brown S, Pasculle AW, Paterson DL, Saul M, Harrison LH, (2005) A large outbreak of Clostridium difficile-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 26: 273-280
161. Kochanek K.D. XJ, Murphy S.L., Miniño A.M., H.C. K, (2009) Deaths: Preliminary Data for 2009. National Vital Statistics Report
162. Pepin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pepin K, Chouinard D, (2004) Clostridium difficile-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne 171: 466-472
163. Carter GP, Douce GR, Govind R, Howarth PM, Mackin KE, Spencer J, Buckley AM, Antunes A, Kotsanas D, Jenkin GA, Dupuy B, Rood JJ, Lyras D, (2011) The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of Clostridium difficile. PLoS pathogens 7: e1002317
164. Barbut F, Delmee M, Brazier JS, Petit JC, Poxton IR, Rupnik M, Lalande V, Schneider C, Mastrantonio P, Alonso R, Kuipjer E, Tvede M, (2003) A European survey of diagnostic methods and testing protocols for Clostridium difficile. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 9: 989-996
165. Smith A, (2005) Outbreak of Clostridium difficile infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 10: E050630 050632

166. Inspection CfHAa, (2006) Investigation into outbreaks of *Clostridium difficile* at Stoke Mandeville Hospital, Buckinghamshire Hospitals NHS Trust. Commission for Healthcare Audit and Inspection, London, United Kingdom
167. Statistics OfN, (2009) Deaths involving *Clostridium difficile*: England & Wales, 2008. Statistical bulletin Office for National Statistics, London, United Kingdom
168. van Steenberg J, Debast S, van Kregten E, van den Berg R, Notermans D, Kuijper E, (2005) Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 10: E050714 050711
169. Kuijper EJ, van den Berg RJ, Debast S, Visser CE, Veenendaal D, Troelstra A, van der Kooi T, van den Hof S, Notermans DW, (2006) *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands. Emerging infectious diseases 12: 827-830
170. Debast SB, Vaessen N, Choudry A, Wiegers-Ligtvoet EA, van den Berg RJ, Kuijper EJ, (2009) Successful combat of an outbreak due to *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 and recognition of specific risk factors. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15: 427-434
171. Pepin J, Valiquette L, Cossette B, (2005) Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne 173: 1037-1042
172. Marin M, Martin A, Alcolea A, Iglesias C, Alcala L, Pelaez T, Sanchez-Somolinos M, Bouza E, (2013) First case of autochthonous *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 detected in Spain. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica
173. Alcalá L. RE, Marín M., Martín A., Catalán P., Bouza E., (2014) Multicenter Study of *Clostridium difficile* infection in Spain: an Update of the Underdiagnosis of *Clostridium difficile* infection in a Whole Nation. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases P0741
174. Marin M, Martin A, Alcolea A, Iglesias C, Alcala L, Pelaez T, Sanchez-Somolinos M, Bouza E, (2014) First case of autochthonous *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 detected in Spain. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica 32: 355-358
175. Frost F, Hurley JS, Petersen HV, Casciano RN, (1999) Estimated incidence of *Clostridium difficile* infection. Emerging infectious diseases 5: 303-304
176. McFarland LV, Beneda HW, Clarridge JE, Raugi GJ, (2007) Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. American journal of infection control 35: 237-253
177. Lessa FC, (2013) Community-associated *Clostridium difficile* infection: how real is it? Anaerobe 24: 121-123
178. Lambert PJ, Dyck M, Thompson LH, Hammond GW, (2009) Population-based surveillance of *Clostridium difficile* infection in Manitoba, Canada, by using interim surveillance definitions. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 30: 945-951
179. Kutty PK, Woods CW, Sena AC, Benoit SR, Naggie S, Frederick J, Evans S, Engel J, McDonald LC, (2010) Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA. Emerging infectious diseases 16: 197-204

180. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Baddour LM, (2012) Outcomes in community-acquired *Clostridium difficile* infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 35: 613-618
181. Songer JG, Anderson MA, (2006) *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12: 1-4
182. Beaugier L, Flahault A, Barbut F, Atlan P, Lalande V, Cousin P, Cadilhac M, Petit JC, (2003) Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 17: 905-912
183. Jump RL, Pultz MJ, Donskey CJ, (2007) Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 2883-2887
184. O'Neill G, Adams JE, Bowman RA, Riley TV, (1993) A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. *Epidemiology and infection* 111: 257-264
185. Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS, (2005) PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal of medical microbiology* 54: 163-166
186. Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese S, Songer JG, (2007) Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of clinical microbiology* 45: 1963-1964
187. Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, Johnson S, Gerding DN, McDonald LC, Limbago BM, (2008) Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging infectious diseases* 14: 1039-1045
188. Debast SB, van Leengoed LA, Goorhuis A, Harmanus C, Kuijper EJ, Bergwerff AA, (2009) *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environmental microbiology* 11: 505-511
189. Goorhuis A, Debast SB, van Leengoed LA, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Kuijper EJ, (2008) *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *Journal of clinical microbiology* 46: 1157; author reply 1158
190. Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, Peregrine AS, Trotz-Williams LA, Arroyo LG, Brazier JS, Weese JS, (2006) *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging infectious diseases* 12: 1730-1736
191. Songer JG, Trinh HT, Dial SM, Brazier JS, Glock RD, (2009) Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 21: 377-380
192. Lefebvre SL, Arroyo LG, Weese JS, (2006) Epidemic *Clostridium difficile* strain in hospital visitation dog. *Emerging infectious diseases* 12: 1036-1037
193. Pirs T, Ocepek M, Rupnik M, (2008) Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *Journal of medical microbiology* 57: 790-792
194. Lefebvre SL, Waltner-Toews D, Peregrine AS, Reid-Smith R, Hodge L, Arroyo LG, Weese JS, (2006) Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. *The Journal of hospital infection* 62: 458-466

195. Borriello SP, Honour P, Turner T, Barclay F, (1983) Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *Journal of clinical pathology* 36: 84-87
196. Lefebvre SL, Reid-Smith R, Boerlin P, Weese JS, (2008) Evaluation of the risks of shedding *Salmonellae* and other potential pathogens by therapy dogs fed raw diets in Ontario and Alberta. *Zoonoses and public health* 55: 470-480
197. Lefebvre SL, Weese JS, (2009) Contamination of pet therapy dogs with MRSA and *Clostridium difficile*. *The Journal of hospital infection* 72: 268-269
198. Coia JE, (2009) What is the role of antimicrobial resistance in the new epidemic of *Clostridium difficile*? *International journal of antimicrobial agents* 33 Suppl 1: S9-12
199. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS, (2007) *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerging infectious diseases* 13: 485-487
200. Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Daignault D, Janecko N, Avery BP, Martin H, Thompsen AD, McDonald LC, Limbago B, Weese JS, (2009) Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerging infectious diseases* 15: 802-805
201. Pituch H, Brazier JS, Obuch-Woszczatynski P, Wultanska D, Meisel-Mikolajczyk F, Luczak M, (2006) Prevalence and association of PCR ribotypes of *Clostridium difficile* isolated from symptomatic patients from Warsaw with macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) type resistance. *Journal of medical microbiology* 55: 207-213
202. Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM, (2009) *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging infectious diseases* 15: 819-821
203. Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, Sutherland AD, (2009) *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. *Emerging infectious diseases* 15: 817-818
204. van den Berg RJ, Claas EC, Oyib DH, Klaassen CH, Dijkshoorn L, Brazier JS, Kuijper EJ, (2004) Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. *Journal of clinical microbiology* 42: 1035-1041
205. Jobstl M, Heuberger S, Indra A, Nepf R, Kofer J, Wagner M, (2010) *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International journal of food microbiology* 138: 172-175
206. Von Abercron SM, Karlsson F, Wigh GT, Wierup M, Krovacek K, (2009) Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in Sweden. *Journal of food protection* 72: 1732-1734
207. Indra A, Lassnig H, Baliko N, Much P, Fiedler A, Huhulescu S, Allerberger F, (2009) *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent? *Wiener klinische Wochenschrift* 121: 91-95
208. Weese JS, Avery BP, Rousseau J, Reid-Smith RJ, (2009) Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. *Applied and environmental microbiology* 75: 5009-5011
209. Vengust M, Arroyo LG, Weese JS, Baird JD, (2003) Preliminary evidence for dormant clostridial spores in equine skeletal muscle. *Equine veterinary journal* 35: 514-516
210. Shim JK, Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN, (1998) Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet* 351: 633-636

211. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ, (2007) Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45: 992-998
212. Pelaez T, Alcalá L, Blanco JL, Alvarez-Perez S, Marin M, Martin-Lopez A, Catalan P, Reigadas E, Garcia ME, Bouza E, (2013) Characterization of swine isolates of *Clostridium difficile* in Spain: a potential source of epidemic multidrug resistant strains? *Anaerobe* 22: 45-49
213. Bartlett JG, (2002) Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *The New England journal of medicine* 346: 334-339
214. Johnson S, Clabots CR, Linn FV, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN, (1990) Nosocomial *Clostridium difficile* colonisation and disease. *Lancet* 336: 97-100
215. Samore MH, DeGirolami PC, Tlucko A, Lichtenberg DA, Melvin ZA, Karchmer AW, (1994) *Clostridium difficile* colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 18: 181-187
216. Bartlett JG, Taylor NS, Chang T, Dzink J, (1980) Clinical and laboratory observations in *Clostridium difficile* colitis. *Am J Clin Nutr* 33: 2521-2526
217. Kyne L, Merry C, O'Connell B, Kelly A, Keane C, O'Neill D, (1999) Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile*. *Age and ageing* 28: 107-113
218. Triadafilopoulos G, Hallstone AE, (1991) Acute abdomen as the first presentation of pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 101: 685-691
219. Farrell RJ, LaMont JT, (2000) Pathogenesis and clinical manifestations of *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. *Current topics in microbiology and immunology* 250: 109-125
220. Gebhard RL, Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, McClain CJ, Ansel HJ, Shaw MJ, Schwartz ML, (1985) Clinical and endoscopic findings in patients early in the course of *clostridium difficile*-associated pseudomembranous colitis. *The American journal of medicine* 78: 45-48
221. Johal SS, Hammond J, Solomon K, James PD, Mahida YR, (2004) *Clostridium difficile* associated diarrhoea in hospitalised patients: onset in the community and hospital and role of flexible sigmoidoscopy. *Gut* 53: 673-677
222. Freiler JF, Durning SJ, Ender PT, (2001) *Clostridium difficile* small bowel enteritis occurring after total colectomy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 33: 1429-1431; discussion 1432
223. Ash L, Baker ME, O'Malley CM, Jr., Gordon SM, Delaney CP, Obuchowski NA, (2006) Colonic abnormalities on CT in adult hospitalized patients with *Clostridium difficile* colitis: prevalence and significance of findings. *AJR American journal of roentgenology* 186: 1393-1400
224. Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, Simmons RL, (2002) Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. *Annals of surgery* 235: 363-372
225. Byrn JC, Maun DC, Gingold DS, Baril DT, Ozao JJ, Divino CM, (2008) Predictors of mortality after colectomy for fulminant *Clostridium difficile* colitis. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 143: 150-154; discussion 155
226. Garcia-Lechuz JM, Hernangomez S, Juan RS, Pelaez T, Alcalá L, Bouza E, (2001) Extra-intestinal infections caused by *Clostridium difficile*. *Clinical*

- microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 7: 453-457
227. Ducroix-Roubertou S, Genet C, Rogez JP, Weinbreck P, Denes E, (2005) [Reactive arthritis due to *Clostridium difficile*]. *Medecine et maladies infectieuses* 35: 419-421
 228. Libby DB, Bearman G, (2009) Bacteremia due to *Clostridium difficile*--review of the literature. *Int J Infect Dis* 13: e305-309
 229. Brown E, Talbot GH, Axelrod P, Provencher M, Hoegg C, (1990) Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 11: 283-290
 230. McFarland LV, Surawicz CM, Stamm WE, (1990) Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. *The Journal of infectious diseases* 162: 678-684
 231. Spencer RC, (1998) Clinical impact and associated costs of *Clostridium difficile*-associated disease. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 41 Suppl C: 5-12
 232. Zilberberg MD, Reske K, Olsen M, Yan Y, Dubberke ER, (2014) Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI) hospitalization among hospitalized patients with an initial CDI episode: a retrospective cohort study. *BMC infectious diseases* 14: 306
 233. Hebuterne X, (2003 Jan) Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6: 49-54.
 234. Triadafilopoulos G, Shah MH, Pothoulakis C, (1991) The chemotactic response of human granulocytes to *Clostridium difficile* toxin A is age dependent. *The American journal of gastroenterology* 86: 1461-1465
 235. Walker AS, Eyre DW, Wyllie DH, Dingle KE, Harding RM, O'Connor L, Griffiths D, Vaughan A, Finney J, Wilcox MH, Crook DW, Peto TE, (2012) Characterisation of *Clostridium difficile* hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. *PLoS medicine* 9: e1001172
 236. Kramer A, Schwebke I, Kampf G, (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC infectious diseases* 6: 130
 237. Kaatz GW, Gitlin SD, Schaberg DR, Wilson KH, Kauffman CA, Seo SM, Fekety R, (1988) Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *American journal of epidemiology* 127: 1289-1294
 238. Viscidi R, Willey S, Bartlett JG, (1981) Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology* 81: 5-9
 239. Fekety R, Shah AB, (1993) Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 269: 71-75
 240. Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN, (1992) Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *The Journal of infectious diseases* 166: 561-567
 241. Tabaqchali S, Wilks M, (1992) Epidemiological aspects of infections caused by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium difficile*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 11: 1049-1057

242. Bignardi GE, (1998) Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *The Journal of hospital infection* 40: 1-15
243. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE, (1989) Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *The New England journal of medicine* 320: 204-210
244. Nath SK, Salama S, Persaud D, Thornley JH, Smith I, Foster G, Rotstein C, (1994) Drug risk factors associated with a sustained outbreak of *Clostridium difficile* diarrhea in a teaching hospital. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses* 5: 270-275
245. Nelson DE, Auerbach SB, Baltch AL, Desjardin E, Beck-Sague C, Rheel C, Smith RP, Jarvis WR, (1994) Epidemic *Clostridium difficile*-associated diarrhea: role of second- and third-generation cephalosporins. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 15: 88-94
246. Talon D, Bailly P, Delmee M, Thouverez M, Mulin B, Iehl-Robert M, Cailleaux V, Michel-Briand Y, (1995) Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of an outbreak of *Clostridium difficile* infection among geriatric patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 14: 987-993
247. Walker KJ, Gilliland SS, Vance-Bryan K, Moody JA, Larsson AJ, Rotschafer JC, Guay DR, (1993) *Clostridium difficile* colonization in residents of long-term care facilities: prevalence and risk factors. *Journal of the American Geriatrics Society* 41: 940-946
248. Johnson S, Samore MH, Farrow KA, Killgore GE, Tenover FC, Lyras D, Rood JI, DeGirolami P, Baltch AL, Rafferty ME, Pear SM, Gerding DN, (1999) Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *The New England journal of medicine* 341: 1645-1651
249. Pepin J, Alary ME, Valiquette L, Raiche E, Ruel J, Fulop K, Godin D, Bourassa C, (2005) Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40: 1591-1597
250. Privitera G, Scarpellini P, Ortisi G, Nicastro G, Nicolin R, de Lalla F, (1991) Prospective study of *Clostridium difficile* intestinal colonization and disease following single-dose antibiotic prophylaxis in surgery. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35: 208-210
251. Yee J, Dixon CM, McLean AP, Meakins JL, (1991) *Clostridium difficile* disease in a department of surgery. The significance of prophylactic antibiotics. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 126: 241-246
252. Choi HK, Kim KH, Lee SH, Lee SJ, (2011) Risk factors for recurrence of *Clostridium difficile* infection: effect of vancomycin-resistant enterococci colonization. *Journal of Korean medical science* 26: 859-864
253. Garey KW, Jiang ZD, Ghantaji S, Tam VH, Arora V, Dupont HL, (2010) A common polymorphism in the interleukin-8 gene promoter is associated with an increased risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51: 1406-1410
254. Schalk E, Bohr UR, König B, Scheinplflug K, Mohren M, (2010) *Clostridium difficile*-associated diarrhoea, a frequent complication in patients with acute myeloid leukaemia. *Annals of hematology* 89: 9-14

255. Young VB, Schmidt TM, (2004) Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. *Journal of clinical microbiology* 42: 1203-1206
256. Yeom CH, Cho MM, Baek SK, Bae OS, (2010) Risk Factors for the Development of *Clostridium difficile*-associated Colitis after Colorectal Cancer Surgery. *Journal of the Korean Society of Coloproctology* 26: 329-333
257. Wren SM, Ahmed N, Jamal A, Safadi BY, (2005) Preoperative oral antibiotics in colorectal surgery increase the rate of *Clostridium difficile* colitis. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 140: 752-756
258. Mulvey MR, Boyd DA, Gravel D, Hutchinson J, Kelly S, McGeer A, Moore D, Simor A, Suh KN, Taylor G, Weese JS, Miller M, (2010) Hypervirulent *Clostridium difficile* strains in hospitalized patients, Canada. *Emerging infectious diseases* 16: 678-681
259. Wenisch JM, Schmid D, Tucek G, Kuo HW, Allerberger F, Michl V, Tesik P, Laferl H, Wenisch C, (2012) A prospective cohort study on hospital mortality due to *Clostridium difficile* infection. *Infection* 40: 479-484
260. Tsiouris A, Neale JA, Reickert CA, Times M, (2012) *Clostridium difficile* of the ileum following total abdominal colectomy, with or without proctectomy: who is at risk? *Diseases of the colon and rectum* 55: 424-428
261. Cornely OA, Crook DW, Esposito R, Poirier A, Somero MS, Weiss K, Sears P, Gorbach S, (2012) Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet infectious diseases* 12: 281-289
262. Koene MG, Mevius D, Wagenaar JA, Harmanus C, Hensgens MP, Meetsma AM, Putirulan FF, van Bergen MA, Kuijper EJ, (2012) *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18: 778-784
263. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, (2014) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 2: 1-26
264. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB, (2007) A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45: 302-307
265. Rodemann JF, Dubberke ER, Reske KA, Seo da H, Stone CD, (2007) Incidence of *Clostridium difficile* infection in inflammatory bowel disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 5: 339-344
266. Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB, Otterson MF, Lundeen S, Skaros S, Weber LR, Komorowski RA, Knox JF, Emmons J, Bajaj JS, Binion DG, (2007) Impact of *Clostridium difficile* on inflammatory bowel disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 5: 345-351
267. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ, (2009) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and

- recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 15: 1053-1066
268. McFarland LV, Coyle MB, Kremer WH, Stamm WE, (1987) Rectal swab cultures for *Clostridium difficile* surveillance studies. *J Clin Microbiol* 25: 2241-2242
 269. DuPont HL, (2012) Approach to the patient with infectious colitis. *Current opinion in gastroenterology* 28: 39-46
 270. Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, Maherault AC, Le Monnier A, Collignon A, (2012) *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55: 1209-1215
 271. Aichinger E, Schleck CD, Harmsen WS, Nyre LM, Patel R, (2008) Nonutility of repeat laboratory testing for detection of *Clostridium difficile* by use of PCR or enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 46: 3795-3797
 272. van den Berg RJ, Vaessen N, Endtz HP, Schulin T, van der Vorm ER, Kuijper EJ, (2007) Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a prospective multicentre study. *J Med Microbiol* 56: 36-42
 273. Cardona DM, Rand KH, (2008) Evaluation of repeat *Clostridium difficile* enzyme immunoassay testing. *J Clin Microbiol* 46: 3686-3689
 274. Louie TJ, Peppe J, Watt CK, Johnson D, Mohammed R, Dow G, Weiss K, Simon S, John JF, Jr., Garber G, Chasan-Taber S, Davidson DM, (2006) Tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 43: 411-420
 275. Kim KH, Fekety R, Batts DH, Brown D, Cudmore M, Silva J, Jr., Waters D, (1981) Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 143: 42-50
 276. Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M, Silva J, Jr., (1981) Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Med* 70: 906-908
 277. McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM, (2002) Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *The American journal of gastroenterology* 97: 1769-1775
 278. Sethi AK, Al-Nassir WN, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Donskey CJ, (2010) Persistence of skin contamination and environmental shedding of *Clostridium difficile* during and after treatment of *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31: 21-27
 279. Burnham CA, Carroll KC, (2013) Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clinical microbiology reviews* 26: 604-630
 280. Planche T, Wilcox M, (2011) Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? *Journal of clinical pathology* 64: 1-5
 281. Bouza E, Pelaez T, Alonso R, Catalan P, Munoz P, Creixems MR, (2001) "Second-look" cytotoxicity: an evaluation of culture plus cytotoxin assay of *Clostridium difficile* isolates in the laboratory diagnosis of CDAD. *The Journal of hospital infection* 48: 233-237
 282. Fang FC, Gerding DN, Peterson LR, (1996) Diagnosis of *Clostridium difficile* colitis. *Annals of internal medicine* 125: 515; author reply 516

283. Peterson LR, Kelly PJ, (1993) The role of the clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Infectious disease clinics of North America* 7: 277-293
284. Stamper PD, Alcabasa R, Aird D, Babiker W, Wehrlin J, Ikpeama I, Carroll KC, (2009) Comparison of a commercial real-time PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 47: 373-378
285. Doern GV, Coughlin RT, Wu L, (1992) Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated gastrointestinal disease: comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxins A and B with a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity assays. *Journal of clinical microbiology* 30: 2042-2046
286. Ota KV, McGowan KL, (2012) *Clostridium difficile* testing algorithms using glutamate dehydrogenase antigen and *C. difficile* toxin enzyme immunoassays with *C. difficile* nucleic acid amplification testing increase diagnostic yield in a tertiary pediatric population. *Journal of clinical microbiology* 50: 1185-1188
287. Riley TV, Brazier JS, Hassan H, Williams K, Phillips KD, (1987) Comparison of alcohol shock enrichment and selective enrichment for the isolation of *Clostridium difficile*. *Epidemiology and infection* 99: 355-359
288. Hink T, Burnham CA, Dubberke ER, (2013) A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of *Clostridium difficile* from stool specimens. *Anaerobe* 19: 39-43
289. Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y, Skitt BL, Allen SD, (1992) Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *Journal of clinical microbiology* 30: 514-516
290. Mundy LS, Shanholtzer CJ, Willard KE, Gerding DN, Peterson LR, (1995) Laboratory detection of *Clostridium difficile*. A comparison of media and incubation systems. *American journal of clinical pathology* 103: 52-56
291. George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM, (1979) Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology* 9: 214-219
292. Wren M, (2010) *Clostridium difficile* isolation and culture techniques. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 646: 39-52
293. Bliss DZ, Johnson S, Clabots CR, Savik K, Gerding DN, (1997) Comparison of cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA) and taurocholate-CCFA for recovery of *Clostridium difficile* during surveillance of hospitalized patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 29: 1-4
294. Arroyo LG, Rousseau J, Willey BM, Low DE, Staempfli H, McGeer A, Weese JS, (2005) Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *Journal of clinical microbiology* 43: 5341-5343
295. She RC, Durrant RJ, Petti CA, (2009) Evaluation of enzyme immunoassays to detect *Clostridium difficile* toxin from anaerobic stool culture. *American journal of clinical pathology* 131: 81-84
296. Eckert C, Burghoffer B, Lalande V, Barbut F, (2013) Evaluation of the chromogenic agar chromID *C. difficile*. *Journal of clinical microbiology* 51: 1002-1004
297. Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Thien HV, Grimprel E, Petit JC, (2002) Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. *Journal of clinical microbiology* 40: 2079-2083

298. Jakobsen L, Tvede M, (2006) [Pseudomembraneous colitis caused by a toxin B-positive and a toxin A-negative strain of *Clostridium difficile*]. *Ugeskrift for læger* 168: 1634-1635
299. Kim H, Riley TV, Kim M, Kim CK, Yong D, Lee K, Chong Y, Park JW, (2008) Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* 46: 1116-1117
300. Stoddart B, Wilcox MH, (2002) *Clostridium difficile*. *Current opinion in infectious diseases* 15: 513-518
301. Chan EL, Seales D, Drum H, (2009) Comparing ImmunoCard with two EIA assays for *Clostridium difficile* toxins. *Clin Lab Sci* 22: 81-85
302. Schmidt ML, Gilligan PH, (2009) *Clostridium difficile* testing algorithms: what is practical and feasible? *Anaerobe* 15: 270-273
303. Carroll KC, (2011) Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: The next generation. *Anaerobe*
304. Chapin KC, Dickenson RA, Wu F, Andrea SB, (2011) Comparison of five assays for detection of *Clostridium difficile* toxin. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 13: 395-400
305. Alcalá L, Marin M, Madrid M, Dominguez-Garcia E, Catalan P, Pelaez MT, Sanchez-Somolinos M, Bouza E, (2010) Comparison of ImmunoCard Toxins A&B and the new semiautomated Vidas *Clostridium difficile* Toxin A&B tests for diagnosis of *C. difficile* infection. *J Clin Microbiol* 48: 1014-1015
306. Alcalá L, Sanchez-Cambronero L, Catalan MP, Sanchez-Somolinos M, Pelaez MT, Marin M, Bouza E, (2008) Comparison of three commercial methods for rapid detection of *Clostridium difficile* toxins A and B from fecal specimens. *J Clin Microbiol* 46: 3833-3835
307. Peterson LR, Olson MM, Shanholtzer CJ, Gerding DN, (1988) Results of a prospective, 18-month clinical evaluation of culture, cytotoxin testing, and culturette brand (CDT) latex testing in the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 10: 85-91
308. Shanholtzer CJ, Willard KE, Holter JJ, Olson MM, Gerding DN, Peterson LR, (1992) Comparison of the VIDAS *Clostridium difficile* toxin A immunoassay with *C. difficile* culture and cytotoxin and latex tests. *Journal of clinical microbiology* 30: 1837-1840
309. Snell H, Ramos M, Longo S, John M, Hussain Z, (2004) Performance of the TechLab C. DIFF CHEK-60 enzyme immunoassay (EIA) in combination with the *C. difficile* Tox A/B II EIA kit, the Triage *C. difficile* panel immunoassay, and a cytotoxin assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of clinical microbiology* 42: 4863-4865
310. Zheng L, Keller SF, Lyerly DM, Carman RJ, Genheimer CW, Gleaves CA, Kohlhepp SJ, Young S, Perez S, Ye K, (2004) Multicenter evaluation of a new screening test that detects *Clostridium difficile* in fecal specimens. *Journal of clinical microbiology* 42: 3837-3840
311. Wren B, Clayton C, Tabaqchali S, (1990) Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. *Lancet* 335: 423
312. Kato N, Ou CY, Kato H, Bartley SL, Brown VK, Dowell VR, Jr., Ueno K, (1991) Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* 29: 33-37
313. Gumerlock PH, Tang YJ, Meyers FJ, Silva J, Jr., (1991) Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces. *Reviews of infectious diseases* 13: 1053-1060

314. Ylisiurua P, Koskela M, Vainio O, Tuokko H, (2013) Comparison of antigen and two molecular methods for the detection of *Clostridium difficile* toxins. *Scandinavian journal of infectious diseases* 45: 19-25
315. Tenover FC, Baron EJ, Peterson LR, Persing DH, (2011) Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection can molecular amplification methods move us out of uncertainty? *The Journal of molecular diagnostics* : JMD 13: 573-582
316. Gilligan PH, (2008) Is a two-step glutamate dehydrogenase antigen-cytotoxicity neutralization assay algorithm superior to the premier toxin A and B enzyme immunoassay for laboratory detection of *Clostridium difficile*? *J Clin Microbiol* 46: 1523-1525
317. Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B, (2010) Evaluation of diagnostic tests for *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 48: 606-608
318. Doing KM, Hintz MS, Keefe C, Horne S, LeVasseur S, Kulikowski ML, (2010) Reevaluation of the Premier *Clostridium difficile* toxin A and B immunoassay with comparison to glutamate dehydrogenase common antigen testing evaluating Bartels cytotoxin and ProGastro Cd polymerase chain reaction as confirmatory procedures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66: 129-134
319. Quinn CD, Sefers SE, Babiker W, He Y, Alcabasa R, Stratton CW, Carroll KC, Tang YW, (2010) C. Diff Quik Chek complete enzyme immunoassay provides a reliable first-line method for detection of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 48: 603-605
320. Larson AM, Fung AM, Fang FC, (2010) Evaluation of *tcdB* real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 48: 124-130
321. Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, Cumpio J, Nomura JH, Vance PH, Weissfeld A, (2010) *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. *J Clin Microbiol* 48: 889-893
322. Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, Carroll KC, (2007) Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 45: 3601-3605
323. Selvaraju SB, Gripka M, Estes K, Nguyen A, Jackson MA, Selvarangan R, (2011) Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in pediatric stool samples: an evaluation of Quik Check Complete Antigen assay, BD GeneOhm Cdiff PCR, and ProGastro Cd PCR assays. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 71: 224-229
324. Wilcox MH, Planche T, Fang FC, Gilligan P, (2010) What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of *Clostridium difficile* infection? *Journal of clinical microbiology* 48: 4347-4353
325. Shetty N, Wren MW, Coen PG, (2011) The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. *The Journal of hospital infection* 77: 1-6
326. Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ, (2013) Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 18: 20381
327. Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, Peterson LR, Davis T, Schreckenberger P, Fang FC, Dascal A, Gerding DN, Nomura JH, Goering RV, Akerlund T, Weissfeld AS, Baron EJ, Wong E, Marlowe EM, Whitmore J, Persing DH, (2010) Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium*

- difficile: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *Journal of clinical microbiology* 48: 3719-3724
328. Figueroa I, Johnson S, Sambol SP, Goldstein EJ, Citron DM, Gerding DN, (2012) Relapse versus reinfection: recurrent *Clostridium difficile* infection following treatment with fidaxomicin or vancomycin. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 Suppl 2: S104-109
 329. Kristjansson M, Samore MH, Gerding DN, DeGirolami PC, Bettin KM, Karchmer AW, Arbeit RD, (1994) Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. *Journal of clinical microbiology* 32: 1963-1969
 330. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, Frost EH, Savelkoul P, Nicholson B, van den Berg RJ, Kato H, Sambol SP, Zukowski W, Woods C, Limbago B, Gerding DN, McDonald LC, (2008) Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *Journal of clinical microbiology* 46: 431-437
 331. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC, (1999) Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS microbiology letters* 175: 261-266
 332. Westblade LF, Chamberland RR, MacCannell D, Collins R, Dubberke ER, Dunne WM, Jr., Burnham CA, (2013) Development and evaluation of a novel, semiautomated *Clostridium difficile* typing platform. *Journal of clinical microbiology* 51: 621-624
 333. Manzoor SE, Tanner HE, Marriott CL, Brazier JS, Hardy KJ, Platt S, Hawkey PM, (2011) Extended multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Clostridium difficile* correlates exactly with ribotyping and enables identification of hospital transmission. *Journal of clinical microbiology* 49: 3523-3530
 334. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, Wewalka G, Allerberger F, Kuijper EJ, (2008) Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *Journal of medical microbiology* 57: 1377-1382
 335. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Pasculle AW, Johnson S, Gerding DN, Muto CA, Harrison LH, (2006) Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *Journal of clinical microbiology* 44: 2558-2566
 336. Hardy K, Manzoor S, Marriott C, Parsons H, Waddington C, Gossain S, Szczepura A, Stallard N, Hawkey PM, (2012) Utilizing rapid multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis typing to aid control of hospital-acquired *Clostridium difficile* Infection: a multicenter study. *Journal of clinical microbiology* 50: 3244-3248
 337. van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CH, Kuijper EJ, (2007) Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of clinical microbiology* 45: 1024-1028

338. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN, Harrison LH, (2010) Multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing reveal genetic relationships among *Clostridium difficile* isolates genotyped by restriction endonuclease analysis. *Journal of clinical microbiology* 48: 412-418
339. Maiden MC, (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual review of microbiology* 60: 561-588
340. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG, (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3140-3145
341. Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Pons JL, (2004) Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *Journal of clinical microbiology* 42: 2609-2617
342. Lemee L, Bourgeois I, Ruffin E, Collignon A, Lemeland JF, Pons JL, (2005) Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading, England)* 151: 3171-3180
343. Harris SR, Cartwright EJ, Torok ME, Holden MT, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Ellington MJ, Quail MA, Bentley SD, Parkhill J, Peacock SJ, (2013) Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases* 13: 130-136
344. Koser CU, Holden MT, Ellington MJ, Cartwright EJ, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Hsu LY, Chewapreecha C, Croucher NJ, Harris SR, Sanders M, Enright MC, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Fraser LJ, Betley JR, Schulz-Trieglaff OB, Smith GP, Peacock SJ, (2012) Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *The New England journal of medicine* 366: 2267-2275
345. Chan JZ, Pallen MJ, Oppenheim B, Constantinidou C, (2012) Genome sequencing in clinical microbiology. *Nature biotechnology* 30: 1068-1071
346. Jolley KA, Maiden MC, (2010) BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC bioinformatics* 11: 595
347. Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZ, Halachev M, Sergeant M, Penn CW, Robinson ER, Pallen MJ, (2012) High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature reviews Microbiology* 10: 599-606
348. Didelot X, Eyre DW, Cule M, Ip CL, Ansari MA, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, Golubchik T, Batty EM, Piazza P, Wilson DJ, Bowden R, Donnelly PJ, Dingle KE, Wilcox M, Walker AS, Crook DW, TE AP, Harding RM, (2012) Microevolutionary analysis of *Clostridium difficile* genomes to investigate transmission. *Genome biology* 13: R118
349. Eyre DW, Golubchik T, Gordon NC, Bowden R, Piazza P, Batty EM, Ip CL, Wilson DJ, Didelot X, O'Connor L, Lay R, Buck D, Kearns AM, Shaw A, Paul J, Wilcox MH, Donnelly PJ, Peto TE, Walker AS, Crook DW, (2012) A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. *BMJ open* 2

350. Bartlett JG, Gerding DN, (2008) Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 1: S12-18
351. Burkart NE, Kwaan MR, Shepela C, Madoff RD, Wang Y, Rothenberger DA, Melton GB, (2011) Indications and Relative Utility of Lower Endoscopy in the Management of *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology research and practice* 2011: 626582
352. Austin M, Mellow M, Tierney WM, (2014) Fecal microbiota transplantation in the treatment of *Clostridium difficile* infections. *The American journal of medicine* 127: 479-483
353. Boland GW, Lee MJ, Cats A, Mueller PR, (1994) Pseudomembranous colitis: diagnostic sensitivity of the abdominal plain radiograph. *Clinical radiology* 49: 473-475
354. Perera AD, Akbari RP, Cowher MS, Read TE, McCormick JT, Medich DS, Celebrezze JP, Jr., Beck SJ, Fischer PE, Caushaj PF, (2010) Colectomy for fulminant *Clostridium difficile* colitis: predictors of mortality. *The American surgeon* 76: 418-421
355. Longo WE, Mazuski JE, Virgo KS, Lee P, Bahadursingh AN, Johnson FE, (2004) Outcome after colectomy for *Clostridium difficile* colitis. *Diseases of the colon and rectum* 47: 1620-1626
356. Stanley JD, Bartlett JG, Dart BWt, Ashcraft JH, (2013) *Clostridium difficile* infection. *Current problems in surgery* 50: 302-337
357. Guarner J, Bhatnagar J, Shane AL, Jones T, DeLeon-Carnes MN, Schemankewitz E, Zaki SR, (2010) Correlation of the detection of *Clostridium difficile* toxins in stools and presence of the clostridia in tissues of children. *Human pathology* 41: 1586-1592
358. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, McFarland LV, Mellow M, Zuckerbraun BS, (2013) Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American journal of gastroenterology* 108: 478-498; quiz 499
359. Martinez FJ, Leffler DA, Kelly CP, (2012) *Clostridium difficile* outbreaks: prevention and treatment strategies. *Risk management and healthcare policy* 5: 55-64
360. Janarthanan S, Ditah I, Adler DG, Ehrinpreis MN, (2012) *Clostridium difficile*-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology* 107: 1001-1010
361. Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT, (2009) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15: 1067-1079
362. Nelson RL, Kelsey P, Leeman H, Meardon N, Patel H, Paul K, Rees R, Taylor B, Wood E, Malakun R, (2011) Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*: CD004610
363. Nelson, (2007) Antibiotic treatment for *Clostridium difficile* – associated diarrhea in adults (Review). *Cochrane Database Systematic Review* 2007 3
364. Teasley DG, Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, Gebhard RL, Schwartz MJ, Lee JT, Jr., (1983) Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for *Clostridium-difficile*-associated diarrhoea and colitis. *Lancet* 2: 1043-1046

365. Wenisch C, Parschalk B, Hasenhundl M, Hirschl AM, Graninger W, (1996) Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 22: 813-818
366. Johnson S, Homann SR, Bettin KM, Quick JN, Clabots CR, Peterson LR, Gerding DN, (1992) Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (fecal excretors) with vancomycin or metronidazole. A randomized, placebo-controlled trial. *Annals of internal medicine* 117: 297-302
367. Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Creixems M, García-Lechuz JM, Bouza E, (2002) Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46: 1647-1650
368. Ramaswamy R, Grover H, Corpuz M, Daniels P, Pitchumoni CS, (1996) Prognostic criteria in *Clostridium difficile* colitis. *The American journal of gastroenterology* 91: 460-464
369. Fernandez A, Anand G, FriedenberG F, (2004) Factors associated with failure of metronidazole in *Clostridium difficile*-associated disease. *Journal of clinical gastroenterology* 38: 414-418
370. Musher DM, Aslam S, Logan N, Nallacheru S, Bhaila I, Borchert F, Hamill RJ, (2005) Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 40: 1586-1590
371. Belmares J, Gerding DN, Parada JP, Miskevics S, Weaver F, Johnson S, (2007) Outcome of metronidazole therapy for *Clostridium difficile* disease and correlation with a scoring system. *The Journal of infection* 55: 495-501
372. Lagrotteria D, Holmes S, Smieja M, Smaill F, Lee C, (2006) Prospective, randomized inpatient study of oral metronidazole versus oral metronidazole and rifampin for treatment of primary episode of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 43: 547-552
373. Marx CE, Morris A, Wilson ML, Reller LB, (1993) Fecal leukocytes in stool specimens submitted for *Clostridium difficile* toxin assay. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 16: 313-315
374. Al-Nassir WN SA, Bobulsky G, Riggs M, Donskey C., (2007.) Metronidazole treatment failure in *Clostridium difficile* – associated disease is associated with suboptimal microbiologic response. 45th Annual Infectious Diseases Society of America, October 2007 Available from: URL: <http://idsa.confex.com/idsa/2007/webprogram/Paper24530.html>
375. Freeman J, Baines SD, Jabes D, Wilcox MH, (2005) Comparison of the efficacy of ramoplanin and vancomycin in both in vitro and in vivo models of clindamycin-induced *Clostridium difficile* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56: 717-725
376. Freeman J, Baines SD, Saxton K, Wilcox MH, (2007) Effect of metronidazole on growth and toxin production by epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotypes 001 and 027 in a human gut model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 60: 83-91
377. Nagy E, Foldes J, (1991) Inactivation of metronidazole by *Enterococcus faecalis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 27: 63-70

378. Modena S, Gollamudi S, FriedenberG F, (2006) Continuation of antibiotics is associated with failure of metronidazole for Clostridium difficile-associated diarrhea. *Journal of clinical gastroenterology* 40: 49-54
379. Odenholt I, Walder M, Wullt M, (2007) Pharmacodynamic studies of vancomycin, metronidazole and fusidic acid against Clostridium difficile. *Chemotherapy* 53: 267-274
380. Gerding DN, Johnson S, (2010) Management of Clostridium difficile infection: thinking inside and outside the box. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51: 1306-1313
381. Tannock GW, Munro K, Taylor C, Lawley B, Young W, Byrne B, Emery J, Louie T, (2010) A new macrocyclic antibiotic, fidaxomicin (OPT-80), causes less alteration to the bowel microbiota of Clostridium difficile-infected patients than does vancomycin. *Microbiology (Reading, England)* 156: 3354-3359
382. Credito KL, Appelbaum PC, (2004) Activity of OPT-80, a novel macrocycle, compared with those of eight other agents against selected anaerobic species. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 4430-4434
383. Babakhani F, Gomez A, Robert N, Sears P, (2011) Killing kinetics of fidaxomicin and its major metabolite, OP-1118, against Clostridium difficile. *Journal of medical microbiology* 60: 1213-1217
384. Babakhani F, Gomez A, Robert N, Sears P, (2011) Postantibiotic effect of fidaxomicin and its major metabolite, OP-1118, against Clostridium difficile. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 4427-4429
385. Mullane KM, Gorbach S, (2011) Fidaxomicin: first-in-class macrocyclic antibiotic. *Expert review of anti-infective therapy* 9: 767-777
386. Artsimovitch I, Seddon J, Sears P, (2012) Fidaxomicin is an inhibitor of the initiation of bacterial RNA synthesis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 Suppl 2: S127-131
387. Babakhani F, Bouillaut L, Gomez A, Sears P, Nguyen L, Sonenshein AL, (2012) Fidaxomicin inhibits spore production in Clostridium difficile. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 Suppl 2: S162-169
388. Babakhani F, Bouillaut L, Sears P, Sims C, Gomez A, Sonenshein AL, (2013) Fidaxomicin inhibits toxin production in Clostridium difficile. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68: 515-522
389. (2011) Assessment report for DIFICLIR (fidaxomicin). In: Editor (ed)^(eds) Book Assessment report for DIFICLIR (fidaxomicin). City, pp.
390. Shue YK, Sears PS, Shangle S, Walsh RB, Lee C, Gorbach SL, Okumu F, Preston RA, (2008) Safety, tolerance, and pharmacokinetic studies of OPT-80 in healthy volunteers following single and multiple oral doses. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52: 1391-1395
391. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Gorbach S, Sears P, Shue YK, (2011) Fidaxomicin versus vancomycin for Clostridium difficile infection. *The New England journal of medicine* 364: 422-431
392. de Lalla F, Nicolin R, Rinaldi E, Scarpellini P, Rigoli R, Manfrin V, Tramarin A, (1992) Prospective study of oral teicoplanin versus oral vancomycin for therapy of pseudomembranous colitis and Clostridium difficile-associated diarrhea. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 36: 2192-2196
393. Wullt M, Odenholt I, (2004) A double-blind randomized controlled trial of fusidic acid and metronidazole for treatment of an initial episode of Clostridium difficile-associated diarrhoea. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 54: 211-216

394. Dudley MN, McLaughlin JC, Carrington G, Frick J, Nightingale CH, Quintiliani R, (1986) Oral bacitracin vs vancomycin therapy for *Clostridium difficile*-induced diarrhea. A randomized double-blind trial. *Archives of internal medicine* 146: 1101-1104
395. Boero M BE, Morgando A, Verme G., (1990) Treatment of pseudomembranous colitis: a randomized controlled trial with rifaximine vs vancomycin. *Microbiologia Medica* 5: 74–77
396. Johnson S, Schriever C, Patel U, Patel T, Hecht DW, Gerding DN, (2009) Rifaximin Redux: treatment of recurrent *Clostridium difficile* infections with rifaximin immediately post-vancomycin treatment. *Anaerobe* 15: 290-291
397. Garey KW, Jiang ZD, Bellard A, Dupont HL, (2009) Rifaximin in treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an uncontrolled pilot study. *Journal of clinical gastroenterology* 43: 91-93
398. Johnson S, Schriever C, Galang M, Kelly CP, Gerding DN, (2007) Interruption of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 44: 846-848
399. Buggy BP, Fekety R, Silva J, Jr., (1987) Therapy of relapsing *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis with the combination of vancomycin and rifampin. *Journal of clinical gastroenterology* 9: 155-159
400. Musher DM, Logan N, Hamill RJ, Dupont HL, Lentnek A, Gupta A, Rossignol JF, (2006) Nitazoxanide for the treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 43: 421-427
401. Musher DM, Logan N, Mehendiratta V, Melgarejo NA, Garud S, Hamill RJ, (2007) *Clostridium difficile* colitis that fails conventional metronidazole therapy: response to nitazoxanide. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 59: 705-710
402. Musher DM, Logan N, Bressler AM, Johnson DP, Rossignol JF, (2009) Nitazoxanide versus vancomycin in *Clostridium difficile* infection: a randomized, double-blind study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48: e41-46
403. Herpers BL, Vlamincx B, Burkhardt O, Blom H, Biemond-Moeniralam HS, Hornef M, Welte T, Kuijper EJ, (2009) Intravenous tigecycline as adjunctive or alternative therapy for severe refractory *Clostridium difficile* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48: 1732-1735
404. Lu CL, Liu CY, Liao CH, Huang YT, Wang HP, Hsueh PR, (2010) Severe and refractory *Clostridium difficile* infection successfully treated with tigecycline and metronidazole. *International journal of antimicrobial agents* 35: 311-312
405. Mascio CT, Mortin LI, Howland KT, Van Praagh AD, Zhang S, Arya A, Chuong CL, Kang C, Li T, Silverman JA, (2012) In vitro and in vivo characterization of CB-183,315, a novel lipopeptide antibiotic for treatment of *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 5023-5030
406. Citron DM, Tyrrell KL, Merriam CV, Goldstein EJ, (2012) In vitro activities of CB-183,315, vancomycin, and metronidazole against 556 strains of *Clostridium difficile*, 445 other intestinal anaerobes, and 56 Enterobacteriaceae species. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 1613-1615
407. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, (2012) Activity of a novel cyclic lipopeptide, CB-183,315, against resistant *Clostridium difficile* and other Gram-

- positive aerobic and anaerobic intestinal pathogens. Antimicrobial agents and chemotherapy 56: 3448-3452
408. Chesnel L, (2012) *Treatment of CDAD with oral CB-183 315: time to recurrence, relapse and re-infection rates compared with vancomycin. Clin. Microbiol. Infect. 18(Suppl 3):380. Clinical Microbiology and Infection 18 (Suppl 3) 380.*
 409. Mascio CT, Chesnel L, Thorne G, Silverman JA, (2014) Surotomycin Demonstrates Low In Vitro Frequency of Resistance and Rapid Bactericidal Activity in Clostridium difficile, Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. Antimicrob Agents Chemother
 410. Baldoni D, Gutierrez M, Timmer W, Dingemanse J, (2014) Cadazolid, a novel antibiotic with potent activity against Clostridium difficile: safety, tolerability and pharmacokinetics in healthy subjects following single and multiple oral doses. The Journal of antimicrobial chemotherapy 69: 706-714
 411. Locher HH, Seiler P, Chen X, Schroeder S, Pfaff P, Enderlin M, Klenk A, Fournier E, Hubschwerlen C, Ritz D, Kelly CP, Keck W, (2014) In vitro and in vivo antibacterial evaluation of cadazolid, a new antibiotic for treatment of Clostridium difficile infections. Antimicrobial agents and chemotherapy 58: 892-900
 412. Locher HH, Caspers P, Bruyere T, Schroeder S, Pfaff P, Knezevic A, Keck W, Ritz D, (2014) Investigations of the mode of action and resistance development of cadazolid, a new antibiotic for treatment of Clostridium difficile infections. Antimicrobial agents and chemotherapy 58: 901-908
 413. Kurtz CB, Cannon EP, Brezzani A, Pitruzzello M, Dinardo C, Rinard E, Acheson DW, Fitzpatrick R, Kelly P, Shackett K, Papoulis AT, Goddard PJ, Barker RH, Jr., Palace GP, Klinger JD, (2001) GT160-246, a toxin binding polymer for treatment of Clostridium difficile colitis. Antimicrobial agents and chemotherapy 45: 2340-2347
 414. Mogg GA, George RH, Youngs D, Johnson M, Thompson H, Burdon DW, Keighley MR, (1982) Randomized controlled trial of colestipol in antibiotic-associated colitis. The British journal of surgery 69: 137-139
 415. Heerze LD, Kelm MA, Talbot JA, Armstrong GD, (1994) Oligosaccharide sequences attached to an inert support (SYNSORB) as potential therapy for antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. The Journal of infectious diseases 169: 1291-1296
 416. Johnson S, Louie TJ, Gerding DN, Cornely OA, Chasan-Taber S, Fitts D, Gelone SP, Broom C, Davidson DM, (2014) Vancomycin, Metronidazole, or Tolevamer for Clostridium difficile Infection: Results From Two Multinational, Randomized, Controlled Trials. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America
 417. Kink JA, Williams JA, (1998) Antibodies to recombinant Clostridium difficile toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of C. difficile-associated disease in a hamster model of infection. Infection and immunity 66: 2018-2025
 418. Lysterly DM, Bostwick EF, Binion SB, Wilkins TD, (1991) Passive immunization of hamsters against disease caused by Clostridium difficile by use of bovine immunoglobulin G concentrate. Infection and immunity 59: 2215-2218
 419. Kelly CP, Pothoulakis C, Vavva F, Castagliuolo I, Bostwick EF, O'Keane JC, Keates S, LaMont JT, (1996) Anti-Clostridium difficile bovine immunoglobulin concentrate inhibits cytotoxicity and enterotoxicity of C. difficile toxins. Antimicrobial agents and chemotherapy 40: 373-379

420. Kelly CP, Chetham S, Keates S, Bostwick EF, Roush AM, Castagliuolo I, LaMont JT, Pothoulakis C, (1997) Survival of anti-Clostridium difficile bovine immunoglobulin concentrate in the human gastrointestinal tract. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41: 236-241
421. Warny M, Fatimi A, Bostwick EF, Laine DC, Lebel F, LaMont JT, Pothoulakis C, Kelly CP, (1999) Bovine immunoglobulin concentrate-clostridium difficile retains C difficile toxin neutralising activity after passage through the human stomach and small intestine. *Gut* 44: 212-217
422. van Dissel JT, de Groot N, Hensgens CM, Numan S, Kuijper EJ, Veldkamp P, van 't Wout J, (2005) Bovine antibody-enriched whey to aid in the prevention of a relapse of Clostridium difficile-associated diarrhoea: preclinical and preliminary clinical data. *Journal of medical microbiology* 54: 197-205
423. Bauer MP, van Dissel JT, (2009) Alternative strategies for Clostridium difficile infection. *International journal of antimicrobial agents* 33 Suppl 1: S51-56
424. Mattila E, Anttila VJ, Broas M, Marttila H, Poukka P, Kuusisto K, Pusa L, Sammalkorpi K, Dabek J, Koivurova OP, Vahatalo M, Moilanen V, Widenius T, (2008) A randomized, double-blind study comparing Clostridium difficile immune whey and metronidazole for recurrent Clostridium difficile-associated diarrhoea: efficacy and safety data of a prematurely interrupted trial. *Scandinavian journal of infectious diseases* 40: 702-708
425. Numan SC, Veldkamp P, Kuijper EJ, van den Berg RJ, van Dissel JT, (2007) Clostridium difficile-associated diarrhoea: bovine anti-Clostridium difficile whey protein to help aid the prevention of relapses. *Gut* 56: 888-889
426. Persky SE, Brandt LJ, (2000) Treatment of recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope. *The American journal of gastroenterology* 95: 3283-3285
427. Rohlke F, Surawicz CM, Stollman N, (2010) Fecal flora reconstitution for recurrent Clostridium difficile infection: results and methodology. *J Clin Gastroenterol* 44: 567-570
428. Yoon SS, Brandt LJ, (2010) Treatment of refractory/recurrent C. difficile-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: a case series of 12 patients. *J Clin Gastroenterol* 44: 562-566
429. Aas J, Gessert CE, Bakken JS, (2003) Recurrent Clostridium difficile colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 36: 580-585
430. MacConnachie AA, Fox R, Kennedy DR, Seaton RA, (2009) Faecal transplant for recurrent Clostridium difficile-associated diarrhoea: a UK case series. *QJM* 102: 781-784
431. Silverman MS, Davis I, Pillai DR, (2010) Success of self-administered home fecal transplantation for chronic Clostridium difficile infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8: 471-473
432. Bakken JS, (2009) Fecal bacteriotherapy for recurrent Clostridium difficile infection. *Anaerobe* 15: 285-289
433. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, Keller JJ, (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. *The New England journal of medicine* 368: 407-415
434. Tvede M, Rask-Madsen J, (1989) Bacteriotherapy for chronic relapsing Clostridium difficile diarrhoea in six patients. *Lancet* 1: 1156-1160

435. Sambol SP, Merrigan MM, Tang JK, Johnson S, Gerding DN, (2002) Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *The Journal of infectious diseases* 186: 1781-1789
436. Borriello SP, Barclay FE, (1985) Protection of hamsters against *Clostridium difficile* ileocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains. *Journal of medical microbiology* 19: 339-350
437. Wilson KH, Sheagren JN, (1983) Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. *The Journal of infectious diseases* 147: 733-736
438. Kyne L, Farrell RJ, Kelly CP, (2001) *Clostridium difficile*. *Gastroenterology clinics of North America* 30: 753-777, ix-x
439. Kelly CP, Kyne L, (2011) The host immune response to *Clostridium difficile*. *Journal of medical microbiology* 60: 1070-1079
440. Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, Kelly CP, (2004) Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS immunology and medical microbiology* 41: 237-242
441. Aronsson B, Granstrom M, Mollby R, Nord CE, (1985) Serum antibody response to *Clostridium difficile* toxins in patients with *Clostridium difficile* diarrhoea. *Infection* 13: 97-101
442. Viscidi R, Laughon BE, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder RW, Bartlett JG, (1983) Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *The Journal of infectious diseases* 148: 93-100
443. Abougergi MS, Kwon JH, (2011) Intravenous immunoglobulin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a review. *Digestive diseases and sciences* 56: 19-26
444. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, Nichol G, Thomas WD, Jr., Leney M, Sloan S, Hay CA, Ambrosino DM, (2010) Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *The New England journal of medicine* 362: 197-205
445. Butala P, Divino CM, (2010) Surgical aspects of fulminant *Clostridium difficile* colitis. *American journal of surgery* 200: 131-135
446. Neal MD, Alverdy JC, Hall DE, Simmons RL, Zuckerbraun BS, (2011) Diverting loop ileostomy and colonic lavage: an alternative to total abdominal colectomy for the treatment of severe, complicated *Clostridium difficile* associated disease. *Annals of surgery* 254: 423-427; discussion 427-429
447. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, Barbut F, Tull P, Gastmeier P, van den Broek PJ, Colville A, Coignard B, Daha T, Debast S, Duerden BI, van den Hof S, van der Kooi T, Maarleveld HJ, Nagy E, Notermans DW, O'Driscoll J, Patel B, Stone S, Wiuff C, (2008) Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 5: 2-20
448. Rebmann T, Carrico RM, Association for Professionals in Infection C, Epidemiology, (2011) Preventing *Clostridium difficile* infections: an executive summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology's elimination guide. *American journal of infection control* 39: 239-242
449. Zafar AB, Gaydos LA, Furlong WB, Nguyen MH, Mennonna PA, (1998) Effectiveness of infection control program in controlling nosocomial *Clostridium difficile*. *American journal of infection control* 26: 588-593
450. Apisarnthanarak A, Zack JE, Mayfield JL, Freeman J, Dunne WM, Little JR, Mundy LM, Fraser VJ, (2004) Effectiveness of environmental and infection

- control programs to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39: 601-602
451. Stone SP, Beric V, Quick A, Balestrini AA, Kibbler CC, (1998) The effect of an enhanced infection-control policy on the incidence of *Clostridium difficile* infection and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in acute elderly medical patients. *Age and ageing* 27: 561-568
 452. Cartmill TD, Panigrahi H, Worsley MA, McCann DC, Nice CN, Keith E, (1994) Management and control of a large outbreak of diarrhoea due to *Clostridium difficile*. *The Journal of hospital infection* 27: 1-15
 453. Gerding DN, Muto CA, Owens RC, Jr., (2008) Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 1: S43-49
 454. Rebmann T, Greene LR, (2010) Preventing catheter-associated urinary tract infections: An executive summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc, Elimination Guide. *American journal of infection control* 38: 644-646
 455. Brooks SE, Veal RO, Kramer M, Dore L, Schupf N, Adachi M, (1992) Reduction in the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an acute care hospital and a skilled nursing facility following replacement of electronic thermometers with single-use disposables. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 13: 98-103
 456. Barbut F, Petit JC, (2001 Aug) Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clin Microbiol Infect* 7: 405-410.
 457. McCoubrey J, Starr J, Martin H, Poxton IR, (2003 Jul) *Clostridium difficile* in a geriatric unit: a prospective epidemiological study employing a novel S-layer typing method. *J Med Microbiol* 52: 573-578.
 458. Mayfield JL, Leet T, Miller J, Mundy LM, (2000) Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 31: 995-1000
 459. Wilcox MH, Fawley WN, (2000) Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. *Lancet* 356: 1324
 460. Barbut F, Jones G, Eckert C, (2011) Epidemiology and control of *Clostridium difficile* infections in healthcare settings: an update. *Current opinion in infectious diseases* 24: 370-376
 461. Worsley MA, (1998) Infection control and prevention of *Clostridium difficile* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 41 Suppl C: 59-66
 462. Thomas C, Stevenson M, Williamson DJ, Riley TV, (2002 Dec 15) *Clostridium difficile*-associated diarrhea: epidemiological data from Western Australia associated with a modified antibiotic policy. *Clin Infect Dis* 35: 1457-1462. Epub 2002 Dec 1452.
 463. McNulty C, Logan M, Donald IP, Ennis D, Taylor D, Baldwin RN, Bannerjee M, Cartwright KA, (1997) Successful control of *Clostridium difficile* infection in an elderly care unit through use of a restrictive antibiotic policy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 40: 707-711
 464. Carling P, Fung T, Killion A, Terrin N, Barza M, (2003 Sep) Favorable impact of a multidisciplinary antibiotic management program conducted during 7 years. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24: 699-706.
 465. Sougioultzis S, Kyne L, Drudy D, Keates S, Maroo S, Pothoulakis C, Giannasca PJ, Lee CK, Warny M, Monath TP, Kelly CP, (2005) *Clostridium difficile*

- toxoid vaccine in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* 128: 764-770
466. Gardiner DF, Rosenberg T, Zaharatos J, Franco D, Ho DD, (2009) A DNA vaccine targeting the receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Vaccine* 27: 3598-3604
 467. Pelaez T, Cercenado E, Alcalá L, Marin M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J, Catalan P, Sánchez-Somolinos M, Bouza E, (2008) Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *Journal of clinical microbiology* 46: 3028-3032
 468. Bouza E, (2012) Consequences of *Clostridium difficile* infection: understanding the healthcare burden. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 Suppl 6: 5-12
 469. Dubberke ER, Olsen MA, (2012) Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 Suppl 2: S88-92
 470. Patterson L, Wilcox MH, Fawley WN, Verlander NQ, Geoghegan L, Patel BC, Wyatt T, Smyth B, (2012) Morbidity and mortality associated with *Clostridium difficile* ribotype 078: a case-case study. *The Journal of hospital infection* 82: 125-128
 471. Alonso R, Gros S, Pelaez T, García-de-Viedma D, Rodríguez-Creixems M, Bouza E, (2001) Molecular analysis of relapse vs re-infection in HIV-positive patients suffering from recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *The Journal of hospital infection* 48: 86-92
 472. Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC, (2000) Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of clinical microbiology* 38: 2386-2388
 473. Do AN, Fridkin SK, Yechouron A, Banerjee SN, Killgore GE, Bourgault AM, Jolivet M, Jarvis WR, (1998) Risk factors for early recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 26: 954-959
 474. Tang-Feldman Y, Mayo S, Silva Jr J, Jr., Cohen SH, (2003) Molecular analysis of *Clostridium difficile* strains isolated from 18 cases of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of clinical microbiology* 41: 3413-3414
 475. Wilcox MH, Fawley WN, Settle CD, Davidson A, (1998) Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection--relapse or reinfection? *The Journal of hospital infection* 38: 93-100
 476. Ackermann G, Degner A, Cohen SH, Silva J, Jr., Rodloff AC, (2003) Prevalence and association of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS(B)) resistance with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51: 599-603
 477. Kim H, Jeong SH, Roh KH, Hong SG, Kim JW, Shin MG, Kim MN, Shin HB, Uh Y, Lee H, Lee K, (2010) Investigation of toxin gene diversity, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolated from 12 hospitals in South Korea. *The Korean journal of laboratory medicine* 30: 491-497
 478. Pituch H, Obuch-Woszczatynski P, Wultanska D, Nurzynska G, Harmanus C, Banaszkiewicz A, Radzikowski A, Luczak M, van Belkum A, Kuijper E, (2011) Characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* strains isolated from adult patients with diarrhoea hospitalized in two university hospitals in Poland, 2004-2006. *Journal of medical microbiology* 60: 1200-1205

- 479. Goldstein EJ, Citron DM, Sears P, Babakhani F, Sambol SP, Gerding DN, (2011) Comparative susceptibilities to fidaxomicin (OPT-80) of isolates collected at baseline, recurrence, and failure from patients in two phase III trials of fidaxomicin against *Clostridium difficile* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 5194-5199
- 480. Liao CH, Ko WC, Lu JJ, Hsueh PR, (2012) Characterizations of clinical isolates of *clostridium difficile* by toxin genotypes and by susceptibility to 12 antimicrobial agents, including fidaxomicin (OPT-80) and rifaximin: a multicenter study in Taiwan. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 3943-3949
- 481. Tickler IA, Goering RV, Whitmore JD, Lynn AN, Persing DH, Tenover FC, (2014) Strain Types and Antimicrobial Resistance Patterns of *Clostridium difficile* Isolates from the United States: 2011-2013. *Antimicrob Agents Chemother*
- 482. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, (2011) Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66: 2227-2234

